



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica

**Efecto neuroprotector del extracto del *zea mays l.* sobre
la bradicinesia y rigidez inducidas por haloperidol en
ratas**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Luciola Manuela JÁUREGUI TENIENTE

ASESOR

Pablo Enrique BONILLA RIVERA

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Jauregui L. Efecto neuroprotector del extracto del *zea mays l.* sobre la bradicinesia y rigidez inducidas por haloperidol en ratas [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2016.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera agradecer a mis padres, Nicéforo y María, por todo el apoyo y amor que me han dado durante todos estos años. Gracias a ustedes he logrado realizar muchos de mis objetivos y muchos de mis sueños. Gracias por todo su sacrificio y por todas sus palabras de ánimo, de consuelo y de esperanza. Mis logros se los dedico a ustedes, ya que nunca hubiera alcanzado nada si ustedes no hubiesen estado a mi lado.

Agradezco también a mi esposo Maxime, por su ayuda, su comprensión y por motivarme siempre en los momentos más difíciles. Gracias por ayudarme con el análisis estadístico, no sé qué hubiera hecho sin tu ayuda.

Deseo agradecer a las personas más importantes para el desarrollo de este trabajo; mis asesores de tesis, el Dr. Pablo Bonilla Rivera y el Q.F. Jorge Arroyo Acevedo. Les agradezco el haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo bajo su supervisión.

Dr. Pablo Bonilla, de usted siempre recordaré su frase "no te preocupes". Yo me decía " sí, sí me preocupo; no puedo evitarlo" pero al verlo a usted, terminaba por convencerme que existen muchas otras posibilidades para llegar a la meta y que, efectivamente, no debía impacientarme. Gracias por todo el tiempo dedicado al desarrollo de este trabajo, gracias por su paciencia y por haber respondido a todas mis interrogantes.

Quisiera agradecer al Q.F. Jorge Arroyo Acevedo por su disponibilidad y su ayuda.

Las siguientes palabras de agradecimiento están dirigidas a los miembros del jurado.
Gracias por todo el tiempo dedicado a este trabajo de tesis.

Agradezco también a mi querida amiga Elizabeth Ortega Romero por toda su ayuda en la realización de esta tesis. La culminación de este trabajo ha sido posible gracias a ti, gracias por todos los momentos que hemos compartido juntas.

Igualmente, agradezco a todas las personas que contribuyeron a la realización de este trabajo de tesis.

RESUMEN

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo para el cual ninguna terapia ha probado tener una acción neuroprotectora. El estrés oxidativo y la neuroinflamación juegan un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad de Parkinson. *Zea mays* L., llamado comúnmente “maíz morado” es una gramínea que contiene una gran cantidad de compuestos fenólicos como flavonoides y antocianinas. La actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *Zea mays* L. fue demostrada por su acción protectora frente a la hemólisis. La actividad antioxidante, fue demostrada por la capacidad de disminución de los marcadores del estrés oxidativo, óxido nítrico y malondialdehído. Los resultados sugieren que *Zea mays* L., debido a su actividad antiinflamatoria y antioxidante, está muy relacionado con la actividad neuroprotectora.

Palabras clave: Enfermedad de Parkinson, neuroprotección, estrés oxidativo, neuroinflamación, actividad antiinflamatoria, actividad antioxidante, *Zea mays* L.

SUMMARY

Parkinson's disease is a neurodegenerative disorder for which no therapy has been prove to be neuroprotective. Oxidative stress and neuroinflammation play an important role in the pathophysiology of Parkinson's disease. *Zea mays* L., commonly called as "maíz morado" is a graminacea that contains a high amount of phenolic compounds such as flavonoids and anthocyanins. The antioxidant activity of *Zea mays* L. was demonstrated by its ability to reduce the oxidative stress marquers, nitric oxid and malondialdehyde. These results suggest that *Zea mays* L., it's much related to a neuroprotective activity due to its anti-inflammatory and antioxidant activities.

Key words: Parkinson's disease, neuroprotection, oxidative stress, neuroinflammation, anti-inflammatory activity, antioxidant activity, *Zea mays* L.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Objetivo general	4
1.2	Objetivos específicos	4
1.3	Hipótesis	4
II.	GENERALIDADES	5
2.1	Estrés oxidativo y radicales libres	5
2.1.1	Radicales libres de oxígeno	5
2.1.1.1	El oxígeno singlete	5
2.1.1.2	Radical superóxido	5
2.1.1.3	Radical hidroxilo	6
2.1.1.4	Radical perhidroxilo	6
2.1.2	Radicales libres de nitrógeno.....	6
2.1.2.1	Óxido nítrico	6
2.1.2.2	Radical peroxinitrito	7
2.1.3	Fuentes exógenas de radicales libres.....	7
2.1.4	Fuentes endógenas de radicales libres	7
2.1.4.1	Peroxidación de lípidos	8
2.1.5	Mecanismos de protección	9
2.1.5.1	Antioxidantes enzimáticos	10
2.1.5.2	Antioxidantes no enzimáticos	10
2.2	Inflamación	11

2.2.1	Mediadores de la inflamación	11
2.2.1.1	Citocinas.....	11
2.2.1.2	Interleuquina 1 (IL-1 β)	12
2.2.1.3	Interferón y	12
2.2.2	Importancia de la inflamación	13
2.3	Enfermedad de Parkinson.....	13
2.3.1	Patogenia.....	15
2.3.2	Síntomas.....	18
2.3.3	Tratamiento.....	18
2.3.3.1	Medicación oral	18
2.3.3.2	Terapias continuas	19
2.3.3.3	Terapias quirúrgicas	19
2.3.3.4	Terapias sintomáticas, incluyendo anti-discinéticos	19
2.3.3.5	Medicamentos neuroprotectores putativos en ensayos clínicos.....	19
2.4	Neuroprotección	20
2.4.1	Mecanismos fisiopatológicos de los agentes neuroprotectores	20
2.4.2	Estrategias farmacológicas de neuroprotección	20
2.5	Compuestos fenólicos	23
2.5.1	Flavonoides.....	25
2.5.2	Actividad biológica	27
2.6	<i>Zea mays</i> L.....	27
2.6.1	Clasificación taxonómica	28

2.6.2	Descripción macroscópica de la planta.....	28
2.6.3	Composición	28
2.6.4	Actividad biológica	29
III.	PARTE EXPERIMENTAL	30
3.1	Materiales, equipos y reactivos	31
3.1.1	Materiales	31
3.1.2	Equipos	31
3.1.3	Reactivos	31
3.2	Métodos	32
3.3	Fundamento	33
3.3.1	Estudio fitoquímico.....	33
3.3.1.1	Marcha de solubilidad y marcha fitoquímica.....	33
3.3.1.1.1	Marcha de solubilidad	33
3.3.1.1.2	Marcha fitoquímica.....	33
3.3.1.2	Análisis cromatográfico	34
3.3.1.3	Análisis estructural	34
3.3.2	Estudio farmacológico.....	34
3.3.2.1	Determinación de la actividad antiinflamatoria in vitro mediante la estabilización de la membrana de glóbulos rojos	34
3.3.2.2	Determinación del marcador del estrés oxidativo, óxido nítrico (Actividad antioxidante).....	35

3.3.2.3	Determinación del marcador del estrés oxidativo, malondialdehído (Actividad antioxidante).....	37
3.4	Procedimiento	38
3.4.1	Estudio fitoquímico.....	38
3.4.1.1	Preparación de la muestra	38
3.4.1.2	Preparación del extracto.....	39
3.4.1.3	Marcha de solubilidad y marcha fitoquímica.....	39
3.4.1.3.1	Marcha de solubilidad	39
3.4.1.3.2	Marcha fitoquímica.....	39
3.4.1.4	Análisis cromatográfico	40
3.4.1.5	Análisis estructural	41
3.4.2	Estudio farmacológico.....	41
3.4.2.1	Determinación de la actividad antiinflamatoria in vitro mediante la estabilización de la membrana de glóbulos rojos	41
3.4.2.1.1	Procedimiento	41
3.4.2.1.2	Análisis estadístico.....	42
3.4.2.2	Determinación del marcador del estrés oxidativo, óxido nítrico(Actividad antioxidante).....	42
3.4.2.2.1	Procedimiento	42
3.4.2.2.2	Análisis estadístico.....	42
3.4.2.3	Determinación del marcador del estrés oxidativo, malondialdehído (Actividad antioxidante).....	43

3.4.2.3.1	Procedimiento	43
3.4.2.3.2	Análisis estadístico.....	43
IV.	Resultados.....	44
4.1	Estudio fitoquímico	44
4.1.1	Obtención dela muestra.....	44
4.1.2	Obtención del extracto	44
4.1.3	Marcha de solubilidad y marcha fitoquímica	44
4.1.3.1	Marcha de solubilidad.....	44
4.1.3.2	Marcha fitoquímica	45
4.1.4	Análisis cromatográfico	45
4.1.5	Análisis estructural.....	49
4.1.5.1	Espectros ultravioleta de las fracciones analizadas	49
4.1.5.2	Estructuras propuestas.....	55
4.2	Estudio farmacológico	56
4.2.1	Determinación de la actividad antiinflamatoria mediante la estabilización de la membrana de glóbulos rojos de ratas normales	56
4.2.1.1	Protección de la membrana de glóbulos rojos.....	56
4.2.1.2	Análisis estadístico	57
4.2.1.2.1	Distribución normal	57
4.2.1.2.2	Análisis de varianza	59
4.2.1.2.3	Análisis de las medias.....	59

4.2.2	Determinación del marcador del estrés oxidativo, óxido nítrico (NO)	
	(Actividad antioxidante)	61
4.2.2.1	Resultados de la determinación del óxido nítrico	61
4.2.2.2	Análisis estadístico	62
4.2.2.2.1	Estadística descriptiva	62
4.2.2.2.2	Análisis estadístico mediante el test de Kruskal-Wallis	62
4.2.3	Determinación del marcador del estrés oxidativo, malondialdehído	
	(Actividad antioxidante)	63
4.2.3.1	Resultados de la determinación del malondialdehído (MDA)	63
4.2.3.2	Análisis estadístico	64
4.2.3.2.1	Estadística descriptiva	64
4.2.3.2.2	Análisis estadístico mediante el test de Kruskal-Wallis	65
V.	DISCUSIÓN	66
VI.	CONCLUSIONES	72
VII.	RECOMENDACIONES	72
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
IX.	ANEXOS	84

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS

FIGURAS

Figura 1. Fases de la peroxidación de lípidos por radicales libres	8
Figura 2. Productos y mecanismos de la peroxidación lipídica	9
Figura 3. Distribución de los cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson.....	14
Figura 4 Resumen esquemáticos de los mecanismos etiopatogénicos e interacciones en las células dopaminérgicas de la sustancia negra en la enfermedad de Parkinson	15
Figura 5. Estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson.....	16
Figura 6. Tres núcleos estructurales de los polifenoles naturales	23
Figura 7. Clasificación de los flavonoides.....	26
Figura 8. Diagrama del presente trabajo de investigación.....	30
Figura 9. Diagrama esquemático representando el principio de la reacción de Griess original.....	36
Figura 10. Diagrama esquemático representando el principio de la reacción de Griess modificada.....	36
Figura 11. Métodos usados para la evaluación del estrés oxidativo.....	38
Figura 12. Cromatograma en capa fina del extracto de <i>Zea mays</i> L. revelada con FeCl_3	46
Figura 13. Cromatograma en capa fina del extracto de <i>Zea mays</i> L. revelado con luz UV 254 nm.....	47
Figura 14. Cromatograma en capa fina del extracto de <i>Zea mays</i> L. revelado con luz UV 366 nm.....	48
Figura 15. Cromatograma en capa fina de hesperidina, extracto de <i>Zea mays</i> L. y quercetina revelada con luz UV 366 nm.	49

Figura 16. Espectro UV de la fracción 1	50
Figura 17. Espectro UV de la fracción 2	50
Figura 18. Espectro UV de la fracción 3	51
Figura 19. Espectro UV de la fracción 4	51
Figura 20. Espectro UV de la fracción 5	52
Figura 21. Espectro UV de la fracción 6	52
Figura 22. Espectro UV de la fracción 7	53
Figura 23. Espectro UV de la fracción 8	53
Figura 24. Espectro UV de la fracción 9	54
Figura 25. Espectro UV de la fracción 10	54
Figura 26. Estructura del 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona perteneciente a la fracción 1	55
Figura 27. Estructura del 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona perteneciente a la fracción 6	55
Figura 28. Estructura del 5,7,8-trihidroxi-4'-metoxiflavona perteneciente a la fracción 10	55
Figura 29. Actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Zea mays</i> L. comparado con los flavonoides quercetina y hesperidina, así como hidrocortisona	57
Figura 30. Nivel del marcador de estrés oxidativo óxido nítrico.....	62
Figura 31. Nivel del marcador de estrés oxidativo malondialdehído.....	64

TABLAS

Tabla 1. Actividad antioxidante de los polifenoles naturales en modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de neurotoxicidad y neurodegeneración	24
Tabla 2. Resultados del ensayo de solubilidad del extracto etanólico de <i>Zea mays</i> L.	44
Tabla 3. Resultados de la marcha fitoquímica del extracto etanólico de <i>Zea mays</i> L.	45
Tabla 4. Datos de la actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Zea mays</i> L.	56
Tabla 5. Test de Shapiro-Wilk	58
Tabla 6. Test de Levene	59
Tabla 7. Test t de <i>Zea mays</i> L. vs hidrocortisona	60
Tabla 8. Test t de <i>Zea mays</i> L. vs quercetina	60
Tabla 9. Test t de <i>Zea mays</i> L. vs hesperidina	61
Tabla 10. Datos de la determinación del marcador oxidativo NO	61
Tabla 11. Estadística descriptiva de los resultados de los tratamientos	62
Tabla 12. Test de Kruskal-Wallis	63
Tabla 13. Datos de la determinación del marcador oxidativo MDA	63
Tabla 14. Estadística descriptiva de los datos de los tratamientos	64
Tabla 15. Test de Kruskal-Wallis	65

ANEXOS

ANEXO I : EFECTO NEUROPROTECTOR DEL EXTRACTO DE <i>Zea mays</i> L. SOBRE LA RIGIDEZ INDUCIDA POR HALOPERIDOL EN RATAS.....	84
---	----

I. INTRODUCCIÓN

Zea mays L. es una variedad de maíz que se caracteriza por poseer una infrutescencia de color morado. Introducido en la alimentación, este fruto es consumido principalmente bajo la forma de bebida (“chicha morada”) y postre (“mazamorra morada”) en Perú.

La coloración morada se debe a la presencia de diferentes compuestos fenólicos tales como las antocianinas, sustancias de actividad antioxidante capaces de reducir la concentración de radicales libres¹. Los radicales libres son producidos durante el proceso metabólico natural de las células y su compensación debe efectuarse mediante la elaboración de antioxidantes a través de un sistema endógeno².

Sin embargo, los problemas ambientales, el estilo de vida y los problemas patológicos ocasionan que los radicales libres se acumulen, ocasionado estrés oxidativo. El estrés oxidativo ha sido relacionado a enfermedades cardíacas³, al cáncer⁴ y a enfermedades neurodegenerativas⁵, entre otras.

La enfermedad de Parkinson es una enfermedad neurodegenerativa que se caracteriza por una degeneración selectiva y progresiva de las neuronas dopaminérgicas del mesencefálico de la parte compacta de la sustancia negra⁶. Esta degeneración está basada en la presencia de radicales libres derivados de oxígeno y en la peroxidación lipídica inducida por estrés oxidativo⁷.

Las neuronas de la sustancia negra son particularmente vulnerables al estrés oxidativo porque el metabolismo oxidativo de la dopamina tiene el potencial para generar radicales libres citotóxicos⁸.

Basándose en la patogenia de la enfermedad de Parkinson y debido a la carestía del haloperidol, la actividad neuroprotectora del extracto de *Zea mays* L. se evaluó mediante las actividades antiinflamatoria y antioxidante.

En los últimos años se ha asociado la inflamación a la enfermedad de Parkinson. En el proceso inflamatorio, la microglía juega un papel importante ya que una vez activada puede producir óxido nítrico, especies reactivas de oxígeno y citoquinas, quienes juntas forman la base de muchas respuestas neuroinflamatorias. Un incremento en las citoquinas pro-inflamatorias como la interleuquina-1 β (IL-1 β) y el interferón gamma ha sido observado en cerebros con la enfermedad de Parkinson. Además, recientes estudios exponen una relación entre la neuroinflamación y la enfermedad de Parkinson⁹.

Uno de los potenciales tratamientos para la enfermedad de Parkinson sería la neuroprotección. Así, se ha demostrado que compuestos con actividad antiinflamatoria también ejercen una actividad neuroprotectora como la quercetina¹⁰ y la hesperidina¹¹.

Recientes estudios relacionan la actividad antioxidante con la actividad neuroprotectora en algunas plantas como *Mucunapruriens*¹² que demuestra actividad neuroprotectora y antioxidante de gran importancia en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson; y también en *Ginkgobiloba*¹³, en el que se postula que la actividad antioxidante es uno de los mecanismos del efecto neuroprotector que posee.

Basándose en la relación entre la actividad antiinflamatoria, antioxidante y el efecto neuroprotector; se postula que el extracto de *Zea mays* L. con estudios de actividad antiinflamatoria y antioxidante también posee actividad neuroprotectora.

En el presente trabajo comprende el estudio fitoquímico, químico y farmacológico de la especie *Zea mays* L. con el fin de elucidar compuestos fenólicos de gran actividad biológica, actividad antioxidante y antiinflamatoria para el tratamiento de afecciones neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson.

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar los tipos de metabolitos secundarios tales como compuestos fenólicos con actividad biológica y con actividad antioxidante para demostrar el efecto neuroprotector del extracto etánolico en *Zea mays* L.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar los tipos de metabolitos secundarios presentes en el *Zea mays*. L.
- Demostrar la actividad antiinflamatoria del extracto de *Zea mays* L.
- Demostrar la actividad antioxidante del extracto de *Zea mays* L.

1.3 HIPÓTESIS

Metabolitos secundarios de estructura fenólica como las antocianinas y flavonoides de *Zea mays* L. tienen actividad neuroprotectora.

II. GENERALIDADES

2.1 ESTRÉS OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES

El estrés oxidativo se define como un desbalance entre las especies pro-oxidantes y las antioxidantes, a favor de las especies pro-oxidantes¹⁴.

Este desbalance, que ocasiona daño celular, es producido por los radicales libres, especies químicas que poseen uno o varios electrones desapareados en su orbital más externo¹⁵.

Los radicales libres son en su mayoría especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS).

2.1.1 Radicales libres de oxígeno

A continuación se describen los radicales libres de oxígeno importantes para el presente trabajo de investigación.

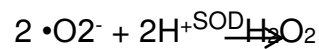
2.1.1.1 *El oxígeno singlete*

Es una forma excitada del oxígeno producida a partir del oxígeno molecular. A pesar de que su vida media es muy corta, es capaz de sustraer un hidrogenión (H^+) de un ácido graso insaturado y así, iniciar la reacción de peroxidación lipídica¹⁶.

2.1.1.2 *Radical superóxido*

El radical superóxido proviene de la reducción univalente del oxígeno molecular. Se produce en todas las células eucariotas, sobre todo en la mitocondria y en el retículo endoplasmático¹⁷. De esta forma, este radicales capaz de lesionar los transportadores de electrones de la cadena respiratoria mitocondrial y del ácido desoxirribonucleico (ADN) e incita la oxidación de la adrenalina, dihidroxifumarato y hidroxidopamina¹⁸.

La eliminación del radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$) formado en las células se realiza por las superóxido dismutasas (SOD) como sigue:



El $\bullet\text{O}_2^-$ es la principal fuente de formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), precursor del radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), la especie reactiva de mayor toxicidad¹⁹.

Igualmente, el $\bullet\text{O}_2^-$ puede reaccionar con el radical óxido nítrico ($\bullet\text{NO}$) dando lugar a la formación de anión peroxinitrito (ONOO^-)¹⁷.

2.1.1.3 Radical hidroxilo

De todos los radicales, el radical hidroxilo es el radical libre más reactivo que existe. Este radical reacciona con las bases puricas y pirimidínicas del ADN, por lo que es un agente genotóxico²⁰. Por otro lado, el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) puede apoderarse de un H^+ de la cadena carbonada de los ácidos grasos poliinsaturados empezando la peroxidación lipídica¹⁶.

2.1.1.4 Radical perhidroxilo

Este radical es producido a partir de $\bullet\text{O}_2^-$. Debido a su característica liposoluble, es un poderoso inductor de la peroxidación lipídica en las membranas biológicas²¹.

2.1.2 Radicales libres de nitrógeno

2.1.2.1 Óxido nítrico

El óxido nítrico es un gas lipofílico e hidrosoluble. Es originado en numerosas células por reacciones catalizadas por la óxido nítrico sintasa (NOS). El óxido nítrico (NO) es un gas cuya vida media es de 5-45 segundos, y genera peroxinitrito gracias a la acción del radical superóxido. El radical superóxido es de naturaleza dañina ya que

puede participar en la generación de lipoperóxidos en combinación con hierro mediante la reacción de Fenton²².

2.1.2.2 Radical peroxinitrito

El radical peroxinitrito (ONOO•) se produce *in vivo* por la reacción entre el óxido nítrico y el radical superóxido. Provoca la peroxidación lipídica e interfiere con la señalización celular mediante la nitración de residuos aromáticos en las proteínas, degradar carbohidratos, nitrar y oxidar la guanosina y fragmentar el ADN²³.

2.1.3 Fuentes exógenas de radicales libres

Entre las fuentes exógenas de radicales libres se tienen:

Los agentes antineoplásicos tales como la adriamicina, bleomicina, daunorrubicina y algunos antibióticos²⁴ que dependen de grupos quinoides o de unión a metales para su actividad. Estas sustancias son capaces de reducir el oxígeno a superóxido, peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo.

Las radiaciones electromagnéticas (rayos X y γ) y radiaciones de partículas (electrones, protones, neutrones, deuterones y partículas α y β)²⁵.

El medio ambiente, principalmente debido a los contaminantes aéreos fotoquímicos, hiperoxia, pesticidas, herbicidas, humo del tabaco, solventes, anestésicos e hidrocarburos aromáticos²⁶.

2.1.4 Fuentes endógenas de radicales libres

Los radicales libres se originan como resultado de la actividad metabólica de las células en el organismo. Se ha considerado la cadena mitocondrial como la principal fuente de ROS; sin embargo, existen otras fuentes endógenas de radicales libres tales como la peroxidación de lípidos, la reacción de Fenton-Haber-Weiss, el sistema de transporte electrónico del retículo endoplásmico, la membrana plasmática

(enzima NAD(P)H-oxidasa), los fagocitos activados, las enzimas solubles, los peroxisomas, entre otras.

A continuación, se explicará la generación de radicales libres a través de la peroxidación lipídica.

2.1.4.1 Peroxidación de lípidos

La peroxidación lipídica está asociada a la inflamación cuyo iniciador principal es el radical hidroxilo²⁷. Entre los lípidos más susceptibles de ser peroxidados se tienen a los ácidos grasos poliinsaturados, formándose un radical alquilo que en presencia de oxígeno pasa a peroxilo, el cual a través de una reacción en cadena oxida a otros ácidos grasos poliinsaturados generando una acumulación de las especies reactivas de oxígeno. De esta forma, la peroxidación lipídica produce más estrés oxidativo por concatenación de sucesivas oxidaciones.

Las consecuencias inmediatas de este fenómeno son estructurales ya que se emplea como sustrato a los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular, la cual queda seriamente dañada; mientras que la cascada de lipoperóxidos se va automagnificando.

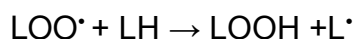
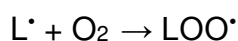
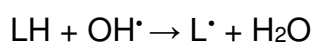


Figura 1. Fases de la peroxidación de lípidos por radicales libres
(LH, ácidos grasos poliinsaturados; L, radical lipídico; LOO, radical peroxilo;
LOOH, hidroxiperóxidos)²⁶

2.1.5.1 Antioxidantes enzimáticos

Entre los antioxidantes enzimáticos se encuentran la glutatión-transferasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, catalasa y la superóxido dismutasa.

2.1.5.2 Antioxidantes no enzimáticos

Entre los antioxidantes no enzimáticos tenemos a:

- Glutatión

El glutatión sustrato de la glutatión peroxidasa y reacciona con $\bullet\text{OH}$, $\bullet\text{O}_2^-$ y radicales libres orgánicos y regenera de vitamina C. El glutatión reacciona directamente con los radicales libres o por medio de la glutatión peroxidasa.

- Vitamina C

Efectiva contra el radical anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, el radical hidroxilo y el oxígeno singlete.

- Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos antioxidantes que han demostrado capturar varias especies oxidantes como el anión superóxido, el radical hidroxilo o el radical peróxido²⁹.

- Antocianinas

Las antocianinas comprenden el grupo más grande de pigmentos solubles en agua del reino vegetal, característicos de las angiospermas y de las plantas florales³⁰.

Existe evidencia que muestra que las antocianinas no solo son no tóxicas y no mutágenicas sino que también tiene propiedades terapéuticas como la actividad antitumoral³¹, actividad antioxidante³² y el tratamiento de desórdenes circulatorios³³.

2.2 INFLAMACIÓN

La inflamación es una respuesta biológica compleja, local y sistémica, de los tejidos vasculares frente a un estímulo peligroso y, a su vez, también es parte de una respuesta inmune no específica que ocurre en reacción a cualquier tipo de agresión que se produzca en el cuerpo³⁴.

Esta respuesta utiliza varios mecanismos tisulares y humorales con el fin de liberarse del agente agresor, y detiene la respuesta cuando se logra el restablecimiento de la integridad del tejido.

El proceso inflamatorio es la respuesta de un organismo vascularizado frente una agresión local. Comúnmente, este es un proceso que se origina en los vasos sanguíneos, induciendo la acumulación de fluido y leucocitos en el tejido extravascular. La inflamación está relacionada con el proceso de reparación celular mediante la regeneración de las células y de otros componentes tisulares.

Existen dos tipos de inflamación, la inflamación aguda y la inflamación crónica. La aguda es de corta duración (minutos, horas o algunos días) mientras que la inflamación crónica, es de larga duración y está coligada histológicamente a la presencia de linfocitos y macrófagos, al mismo tiempo que la proliferación del tejido conjuntivo y de vasos sanguíneos.

2.2.1 Mediadores de la inflamación

2.2.1.1 Citocinas

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular a menudo glicosiladas que sintetizan las células del sistema inmune (en la mayoría de los casos) en respuesta a los patógenos o sus productos o a otras señales relacionadas.

Forman parte de las citocinas las linfocinas, monocinas, quimiocinas, interleucinas, interferones y factores estimuladores de colonias. Estos nombres hacen referencia al origen (linfocitos, monocitos) o función de las citocinas (quimiotaxis, inhibición viral, hematopoyesis, etc.).

Las principales citocinas que actúan en la respuesta inflamatoria son: interleuquina 1 beta ($IL-1\beta$), factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$), interleuquina 12 ($IL-12$), interleuquina 16 ($IL-16$) y los interferones. Todas ellas son citocinas proinflamatorias. $IL-6$ e $IL-12$, además, actúan en la inmunidad específica. También existen interleucinas anti-inflamatorias como la interleuquina 10 ($IL-10$) quien inhibe los macrófagos y la producción de citocinas de células T^{35} .

2.2.1.2 Interleuquina 1 ($IL-1\beta$)

Son generados en grandes cantidades como respuesta a infecciones o cualquier tipo de lesión o estrés y es un mediador clave en la respuesta inflamatoria ocasionando fiebre, neutrofilia y el inicio de la respuesta de la fase aguda (mediante el hígado comienza a secretar distintas proteínas que facilitan la opsonización de bacterias). Es producida principalmente por las células del sistema inmunitario.

2.2.1.3 Interferón γ

Existen tres tipos de interferones: el tipo I comprende el subtipo α y los subtipos β , ϵ , ω y κ , y utilizan los receptores de membrana FNAR 1 y 2. El tipo II corresponde al interferón γ ($IF-\gamma$) y el tipo III, recientemente descubierto corresponde al tipo λ .

La producción de interferones se inicia luego de la liberación de otras citocinas como la $IL-1\beta$ y el factor de necrosis tumoral. Ellos participan en la generación de estrés oxidativo a través de la activación de la níttrico-sintetasa inducible.

2.2.2 Importancia de la inflamación

Actualmente se ha comprobado que patologías como la hipertensión arterial, la aterosclerosis, la diabetes, la obesidad y las enfermedades neurodegenerativas son enfermedades con un claro componente inflamatorio.

El envejecimiento fisiológico y muchas de las enfermedades asociadas a la inflamación son producidos debido a un aumento de las citocinas pro-inflamatorias y/o quimiocinas, además del estrés oxidativo. Este aumento parece estar mediado, al menos en parte, a través de la activación del factor de transcripción nuclear (NFkB) quien es sensible a las especies reactivas de y que está muy relacionado a la apoptosis^{36,37,38}. Asimismo, el NFkB es sumamente importante en los procesos inflamatorios y en la respuesta inmune ya que activa las citocinas IL-1 β ³⁹, IL6 y el factor de necrosis tumoral, la enzimas ciclo-oxigenasa 2 y la óxido nítrico sintasa inducible⁴⁰.

De esta forma, un desbalance en el estado inflamatorio del organismo puede ser el responsable de enfermedades relacionadas con la edad como la diabetes mellitus tipo 2, la arteriosclerosis, el cáncer, Alzheimer y Parkinson⁴¹.

2.3 ENFERMEDAD DE PARKINSON

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por la pérdida de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra y el depósito intracelular de los cuerpos de Lewy⁴². La proteína principal de estos depósitos es el α -sinucleína quien es universalmente expresada en el cerebro. Estudios sugieren que el incremento neuronal de los niveles de la proteína α -sinucleína es un factor primordial en el desarrollo de la EP⁴³. Mutaciones y super expresión de α -synucleína parecen ser

especialmente tóxicos para las neuronas dopaminérgicas debido a que los aductos dopamina-sinucleína podrían inhibir la autofagia mediada por chaperonas⁴⁴.

Una de las características de las neuronas de la sustancia negra es la acumulación edad-dependiente de la neuromelanina. La neuromelanina es un pigmento marrón oscuro que acumula iones metálicos, particularmente hierro⁴⁵.

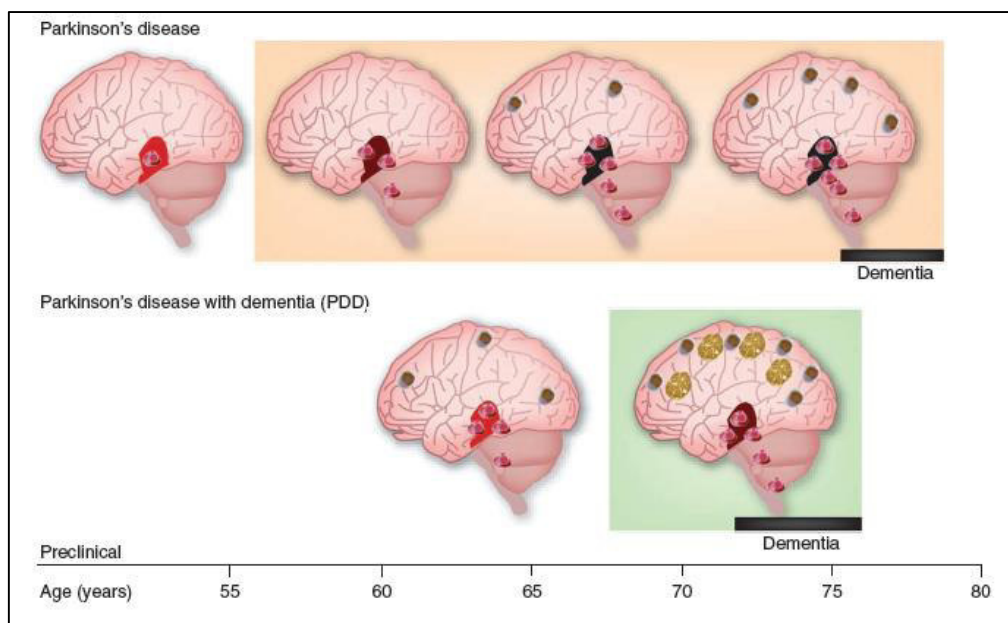


Figura 3. Distribución de los cuerpos de Lewy en la enfermedad de Parkinson (Age (years), edad (años))⁴²

La figura 3 muestra datos patológicos de casos de estudios longitudinales en pacientes que desarrollaron la EP a los 55 años y otros que lo desarrollaron a los 70 años. La severidad de la pérdida de las células dopaminérgicas está relacionada a la duración de los síntomas. Así, la pérdida de células dopaminérgicas es mayor en los pacientes que han tenido los síntomas por largo tiempo (representada en color negro). La infiltración de los cuerpos de Lewy es más marcada en pacientes que han desarrollado tarde la enfermedad. La demencia, como lo indica la barra inferior, se desarrolla en pacientes en los cuales la EP se ha desarrollado tardíamente⁴².

2.3.1 Patogenia

Una teoría que podría explicar el desarrollo de esta enfermedad está basada en que la homeostasis de la sustancia negra es vulnerable a diversos factores celulares, genéticos y medio ambientales, los cuales independientemente o conjuntamente serían los causantes de la muerte neuronal⁴⁶.

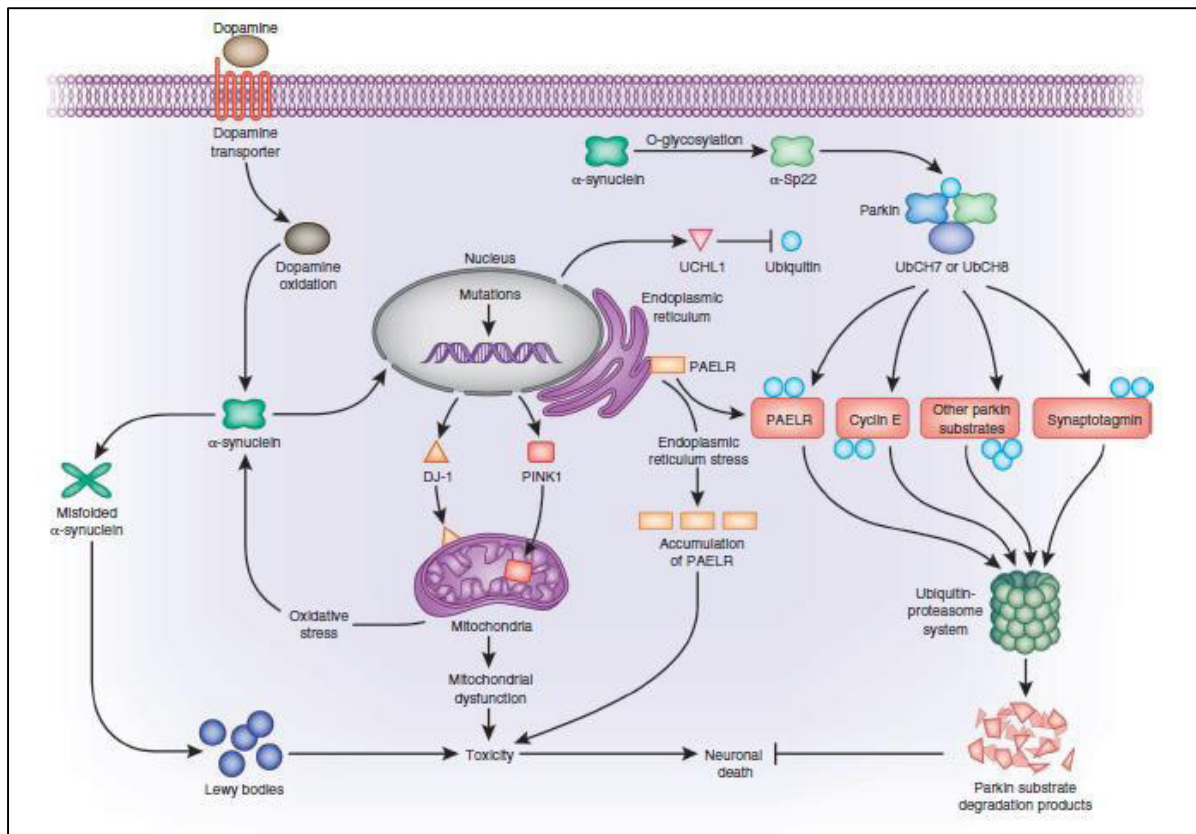


Figura 4 Resumen esquemáticos de los mecanismos etiopatogénicos e interacciones en las células dopaminérgicas de la sustancia negra en la enfermedad de Parkinson

(α -Sp22, forma glicosilada de 22 kilo dalton del α -sinucleína, PAELR, receptor del endotelio asociado al Parkinson, UbCH7, enzima conjugada ubiquitina 7, UbCH8, enzima conjugada de la ubiquitina 8, UCHL1, ubiquitina hidrolasa L1 terminal carboxilo)⁴²

Estos factores podrían ocasionar disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, degradación anormal de las proteínas debido a las alteraciones en el sistema de la

ubiquitina o en autofagia mediada por las chaperonas, y por otras formas de disfunción subcelular. El estrés oxidativo ha sido asociado a la pérdida de las vías dopaminérgicas desde la perspectiva de la producción de especies tóxicas a través de la autooxidación de L-dopa y dopamina^{47,48}.

La dopamina es un neurotransmisor esencial, pero como es un catecol, también es un buen agente quelante de metales y un potencial donador de electrones. La dopamina utiliza los metales como el Cu^{+2} y Fe^{+3} , reduce su estado de oxidación y genera la producción de H_2O_2 ; estableciendo las condiciones para la reacción de Fenton.

Deficiencias en los antioxidantes principales como la catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa, junto con niveles bajos de glutatión sugiere que el estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson contribuye al desarrollo de la enfermedad^{46,49}.

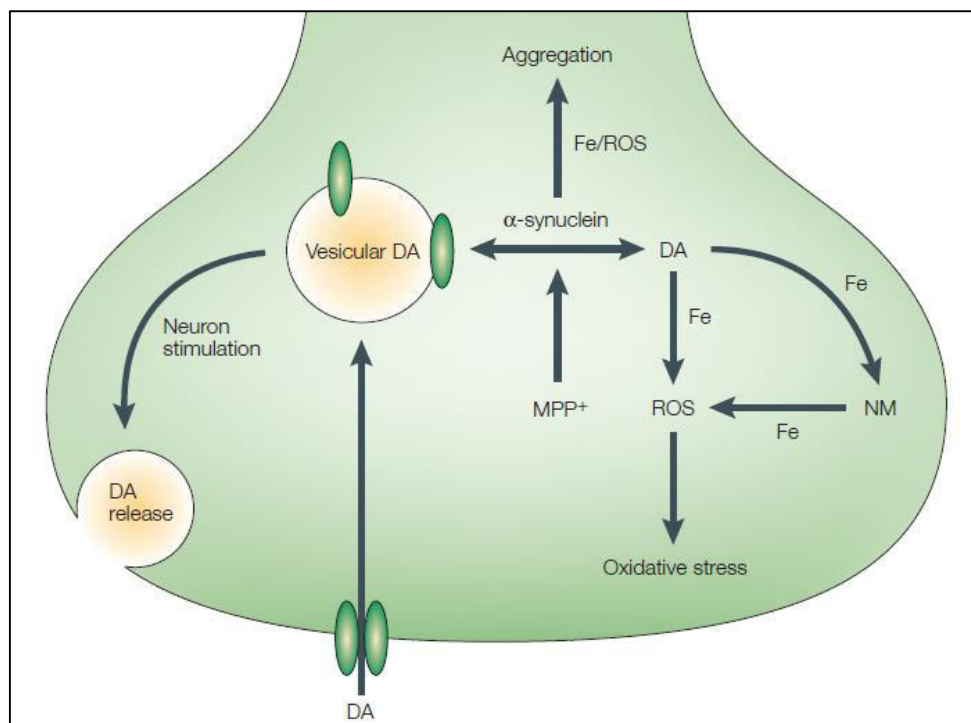


Figura 5. Estrés oxidativo en la enfermedad de Parkinson
(DA, dopamina; NM, neuromelanina; MPP, 1-metil-4-fenil piridina)⁵⁰

Posteriormente, el daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN fue encontrado, confirmando que el estrés oxidativo tiene influencia significativa en la EP.

Actualmente hay evidencia que sugiere que una reacción local inmune está presente en las regiones del cerebro afectadas con la enfermedad de Parkinson.

La inflamación es silenciosa debido a que el cerebro carece de fibras del dolor. Además, la reacción local inmune no involucra el sistema inmune periférico. Ella ocurre sin anticuerpos y sin la participación significativa de células T. Sin embargo, la reacción depende en la síntesis de componentes antiinflamatorios por las neuronas locales, la glía y especialmente por los fagocitos residentes; quienes en el cerebro son la microglía.

En el desarrollo de la neuroinflamación están involucrados el sistema complementario, la microglía y las citocinas.

Sistema complementario puede ser activado por moléculas distintas a los anticuerpos como la proteína C reactiva quien se encuentra en concentraciones elevadas en la sustancia negra.

La microglía, una vez activada, sobrerregula o sobreexpresa una variedad de receptores y otras moléculas involucradas en la inflamación y fagocitosis. Ella produce grandes cantidades de anión superóxido y otras neurotoxinas⁵¹. La microglía puede ser activada por los productos del sistema complementario, las citocinas inflamatorias y por la cromogranina^{52,53}.

Las citocinas inflamatorias como el TNF- α , interleuquina-1 β e interleuquina-6 amplifican, mantienen la inflamación y las respuestas inmunes. Concentraciones elevadas de IL-1 β , IL-6 y TNF- α han sido encontradas en los ganglios basales de

pacientes con la enfermedad de Parkinson. Además la IL-1 β ha sido hallada en la sustancia negra de pacientes con la enfermedad de Parkinson⁵⁴.

2.3.2 Síntomas

Clínicamente, la enfermedad de Parkinson es heterogénea y se desarrolla de diferentes maneras en los pacientes. Las alteraciones motoras son los síntomas más resaltantes de la enfermedad y, debido a su complejidad y variedad, han sido clasificadas en distintos subtipos tales como:

- Temblores (predominantes en pacientes jóvenes).
- Inestabilidad postural y alteraciones de la marcha, observadas en personas mayores de 70 años. Es caracterizado por acinesia, rigidez, alteraciones de la marcha y problemas en el equilibrio.
- Bradicinesia, síntoma más incapacitante de la enfermedad de Parkinson que se manifiesta durante la fase temprana en la dificultad al caminar, hablar y en la falta de expresión facial.

2.3.3 Tratamiento

2.3.3.1 Medicación oral

- Levodopa + inhibidor de la dopadecarboxilasa + inhibidor de catecol-O-metiltransferasa.
- Agonistas de la dopamina, incluyendo formulaciones de liberación controlada como ropinirola y pramipexola.
- Inhibidores de la monoamina oxidasa como la selegilina, rasagilina.
- Anticolinérgicos como la trihexifenidil.
- Antiglutamatérgicos como la amantadina⁴².

2.3.3.2 Terapias continuas

- Agonistas de la dopamina: subcutáneo a intravenoso como apomorfina y lisurida.
- Parches transdérmicos como rotigotina.
- Levodopa intraduodenal como duodopa⁴².

2.3.3.3 Terapias quirúrgicas

- Estimulación profunda del núcleo subtalámico del cerebro, glóbulos pálidos de la parte interna.
- Lesiones como subtalamotomía y palidotomía⁴².

2.3.3.4 Terapias sintomáticas, incluyendo anti-discinéticos

- Agonistas parciales de la dopamina como pardoprunox.
- Antagonistas adenosina A2a.
- Safinamida: inhibidor MAOB, bloqueador del canal de sodio y anti-glutamatérgico.
- Zonisamida: inhibidos MAOB, bloqueador de la liberación de glutamato mGluR5 antagonistas.
- Antagonistas alfa-adrenoreceptor como fipamexola.
- Antagonistas AMPA como perampanel, talampanel.
- Agonistas parciales 5HT2A como pimavanserin⁴².

2.3.3.5 Medicamentos neuroprotectores putativos en ensayos clínicos

- Pramipexola: agonista de la dopamina
- Coenzima Q10: antioxidantes y potenciador de la cadena respiratoria
- Creatina: potenciador de la síntesis del ATP.

- Polifenoles de té verde: antioxidante
- Inosina: incrementa el urato
- Isradipina: bloqueador del canal de calcio⁴²

2.4 NEUROPROTECCIÓN

La neuroprotección puede ser definida como la consecuencia de cualquier intervención que produce beneficios durables favorablemente a través de la influencia en la etiología o la patogenia, e impidiendo con ello el desarrollo clínico de la enfermedad⁵⁵.

2.4.1 Mecanismos fisiopatológicos de los agentes neuroprotectores

Los principales mecanismos fisiopatológicos sobre los cuales los agentes neuroprotectores pueden actuar son: ^{55,56}

- Deficiencia mitocondrial del complejo 1
- Daño por radicales libres y estrés oxidativo
- Disfunción del proteasoma
- Apoptosis
- Inflamación (activación microglial)

2.4.2 Estrategias farmacológicas de neuroprotección

El deterioro celular causado por radicales libres y otros electrófilos, usualmente llamado estrés oxidativo, puede ser disminuido mediante las siguientes estrategias farmacológicas:

- Inhibición de la formación de radicales libres.
- Eliminación directa de radicales libres mediante compuestos antioxidantes.
- Fortalecimiento de la célula y su capacidad para reparar el daño celular.

De esta forma, los agentes neuroprotectores pueden ser clasificados de la siguiente forma según su mecanismo de acción:

Los compuestos que previenen la formación de radicales libres (antioxidantes indirectos) son sustancias que no intervienen directamente con los radicales libre generados bajo condiciones de estrés oxidativo, pero que a través de una variedad de mecanismos, inhiben la formación de estas especies. Entre estos compuestos tenemos a los quelantes que actúan secuestrando los metales de transición redox activo. Los metales de transición están presentes en cantidades elevadas en enfermedades neurodegenerativas, y están presentes como parte integral de agregados insolubles de placas de proteínas neurotóxicas. Otros compuestos incluidos en la categoría de antioxidantes indirectos son:

- Inhibidores de la oxidasa
- Medicamentos anti-inflamatorios esteroideos/ no-esteroideos
- Inhibidores de la ciclooxigenasa
- Inhibidores de la óxido nítrico sintetasa
- Antagonistas de los receptores de glutamato
- Antagonistas del calcio
- Antagonistas de los receptores de dopamina

Los compuestos que interfieren químicamente con los radicales libres (antioxidantes directos) en general no dependen de las macromoléculas celulares endógenas para ejercer su acción, pero reaccionan con las moléculas de radicales libres *per se*. La mayoría de los antioxidantes en este grupo son antioxidantes rompedores de cadenas, como los fenoles que pueden ser divididos en monofenoles que son principalmente endógenos (tocoferol, estrógeno, serotonina o derivados de tirosina);

y polifenoles que son principalmente exógenos como flavonoides, estilbenos e hidroquinonas. Otro grupo de antioxidantes directos son los polienos (caroteno, licopeno, retinol y otros terpenos químicos) cuya fuente principal de obtención son las plantas. Estas estructuras están consideradas como antioxidantes de membrana las cuales podrían intervenir protegiendo las células del daño foto-oxidativo.

Los compuestos que limitan la extensión del daño celular al reducir la carga de radicales libres producto de metabolitos secundarios (antioxidantes metabólicos) son aquellos descritos como cofactores esenciales del metabolismo oxidativo eucariótico. En las enfermedades neurodegenerativas, estos compuestos podrían estabilizar o mejorar el metabolismo energético cerebral (y no cerebral) y mejorar la función de las mitocondrias. Muchos de estos compuestos son vitaminas o micronutrientes. El concepto de la estabilización metabólica está basada en la idea que el estrés oxidativo constituye generalmente un enorme desafío metabólico para la célula, ya que la célula debe hacerse cargo de reparar el daño oxidativo, del retiro de peróxidos, la proteólisis y re-síntesis de proteínas de clivaje oxidativo, todo esto junto a los efectos de la excitotoxicidad, requiere grandes cantidades de ATP y NAD(P)H, mientras que las mutaciones no reparadas de ADN, pueden producir directamente apoptosis celular. La mitocondria es la fuente principal de energía metabólica, especialmente de las neuronas, pero ellas son al mismo tiempo, la principal fuente de radicales libres como el superóxido (SO) o las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno; lo que ocasiona una situación compleja.

Algunos de estos compuestos que limitan la extensión del daño celular son:

- Carnitina

- Creatina
- N-butil- α -fenilnitroa
- Piruvato e hidroxibutirato
- Acido lipoico
- Nicotinamide
- Ubiquinona

2.5 COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos están ampliamente distribuidos en las plantas comestibles y muestran diversas estructuras, principalmente a través de anillos aromáticos hidroxilados. En las plantas, la principal función de los polifenoles es la protección de éstas frente a las especies reactivas de oxígeno producidas durante la fotosíntesis.

La clasificación de los polifenoles está basada principalmente en núcleos de estructuras que aparecen como unidades repetidas en los diferentes compuestos fenólicos presentes en la naturaleza. Tres núcleos estructurales han sido identificados en esta clasificación⁵⁷, leucoantocianidinas (I), glucósidos de flavonas (II) y esteres y amidas de ácidos hidroxicinamicos (III).

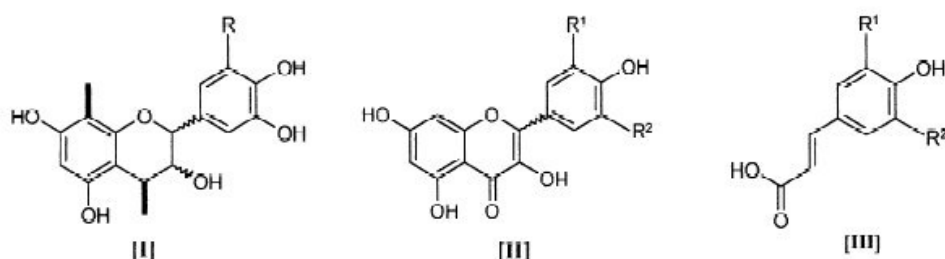


Figura 6. Tres núcleos estructurales de los polifenoles naturales
Leucoantocianidinas (I), glucósidos de flavonas (II), esteres y amidas de ácidos
hidroxicinamicos (III)⁵⁷

Los núcleos estructurales en estos sistemas esta generalmente compuesto de dos entidades repetidas, una parte fenólica aromática y otra el enlace. Los polifenoles se clasifican comúnmente en ácidos fenólicos, estíbenos, flavonoides y lignanos. Dentro de los flavonoides se encuentran a su vez, las chalconas, las flavononas, los flavonones, los flavanoles y las antocianinas, entre otros.

Los polifenoles ejercen su actividad antioxidante a través de diferentes mecanismos como la interacción con la vía del HIF-1 α , induciendo la expresión de genes protectores contra los OS, regulando las especies reactivas de oxígeno mediante la interacción con los mecanismos de oxidación y la captura de iones metálicos.⁵⁸

Entre las plantas con polifenoles con actividad antioxidante se encuentran el *Hedeomamultiflorum*⁵⁹, *Osmanthusfragrans*⁵⁹, *Mucunapruriens*¹² y *Ginkgobiloba*¹³.

Tabla 1. Actividad antioxidante de los polifenoles naturales en modelos *in vivo* e *in vitro* de neurotoxicidad y neurodegeneración

(Azadeh et al) ⁵⁹

Substance	Studied cell line/animal model	Effect	References
Aloe-emodin	N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced toxicity in retinal ganglion cells (RGCs)	<ul style="list-style-type: none"> • Elevates levels of RNA and protein expression of superoxide dismutase (SOD) • Attenuates NMDA-induced apoptosis of RGCs 	Lin et al. (2007)
Curcumin	N27 dopaminergic neurons	<ul style="list-style-type: none"> • Protects against mitochondrial complex I inhibition (leading to mitochondrial dysfunction) and NS 	Mythri et al. (2011)
Curcumin	Homocysteine-induced neurotoxicity in rats	<ul style="list-style-type: none"> • Reduces Malondialdehyde (MDA)^a and Superoxide anion levels • Reduces lipid peroxidation 	Ataie et al. (2010)
Curcumin Curcumin	N27 dopaminergic neuronal cell line 3-Nitropropionic acid (3-NP)-induced neurotoxicity in rats	<ul style="list-style-type: none"> • Improves learning and memory in rats • Increases glutathione^b (GSH) levels • Improves the 3-NP-induced motor and cognitive impairment • Attenuates 3-NP-induced OS (including lipid peroxidation, reduced GSH and nitrite activity) • Restores the decreased succinate dehydrogenase^c activity 	Harish et al. (2010) Kumar et al. (2007)
Epigallocatechingallat (EGCG)	Glucose oxidase-induced neurotoxicity in H 19-7 (a rat neuronal cell line)	<ul style="list-style-type: none"> • Enhances cellular resistance to glucose oxidase-mediated oxidative damage • Elevates heme oxygenase-1^d (HO-1) mRNA and protein expression 	Romeo et al. (2009)
EGCG	Glutamate-induced toxicity in HT22 mouse hippocampus neuronal cells, Kainic acid-induced neurotoxicity in rats	<ul style="list-style-type: none"> • Activates transcription factor Nrf2^e • Reduces glutamate-induced oxidative cytotoxicity • Inactivates the NF-κB signaling 	Kang et al. (2010) narhwa ^f

Tabla 1. Actividad antioxidante de los polifenoles naturales en modelos *in vivo* e *in vitro* de neurotoxicidad y neurodegeneración (Azadeh et al)⁵⁹ continuación

Polyphenol-rich <i>Hedeoma multiflorum</i> extract	Biochemical assay on rat brain homogenates	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibits lipid peroxidation • Scavenges 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radicals • Scavenges DPPH and hydroxyl anions • Inhibits lipid peroxidation 	Dade et al. (2011)
Polyphenol-rich <i>osmanthus fragrans</i> extract	Glutamate, arachidonic acid, and 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rat primary cortical neurons	<ul style="list-style-type: none"> • Prevent the burst of excitatory amino acids in response to ischemia • Reduce brain infarct volumes • Enhance the residual cerebral blood flow during occlusion and reperfusion • Modulate expression of proteins involved in the maintenance of neuronal caliber and axon formation • Reduces NADPH⁸ oxidase-mediated generation of ROS • Inhibits microglia activation • Attenuates the activation of MAPK and NF-κB signaling pathways • Implies neuroprotection against LPS-induced dopaminergic neurodegeneration 	Lee et al. (2007)
Red wine polyphenol compounds	Rat model of ischemic cerebral stroke	<ul style="list-style-type: none"> • Prevent the burst of excitatory amino acids in response to ischemia • Reduce brain infarct volumes • Enhance the residual cerebral blood flow during occlusion and reperfusion • Modulate expression of proteins involved in the maintenance of neuronal caliber and axon formation • Reduces NADPH⁸ oxidase-mediated generation of ROS • Inhibits microglia activation • Attenuates the activation of MAPK and NF-κB signaling pathways • Implies neuroprotection against LPS-induced dopaminergic neurodegeneration 	Ritz et al. (2008)
Resveratrol	Lipopolysaccharide (LPS)-induced dopaminergic neurodegeneration in rat	<ul style="list-style-type: none"> • Induces heme oxygenase 1^d (HO-1) in a dose- and time-dependent manner • Protects mouse neurons, subjected to an optimized ischemic-reperfusion stroke model • Protects neurons against excitotoxicity 	Zhang et al. (2010)
Resveratrol	Glutamate-induced toxicity in mice primary culture of neurons Optimized ischemic-reperfusion stroke model in mice	<ul style="list-style-type: none"> • Induces heme oxygenase 1^d (HO-1) in a dose- and time-dependent manner • Protects mouse neurons, subjected to an optimized ischemic-reperfusion stroke model • Protects neurons against excitotoxicity 	Sakata et al. (2010)

2.5.1 Flavonoides

Los flavonoides existen como glicósidos en las plantas, y son clasificados según su estructura y el estado de oxidación del anillo pirano central.

Lavía de biosíntesis (parte del mecanismo fenilpropanoide) comienza con la condensación de una molécula de p-cumaroil-CoA con tres moléculas de malonil-CoA para generar una chalcona 4',2',4',6'-tetrahidroxichalcona, catalizada por la chalcona sintasa. El siguiente paso es la isomerización de la chalcona en flavona mediante la chalcona isomerasa. A partir de esta etapa, la vía de síntesis se divide y genera diferentes clases de flavonoides, incluyendo las auronas, dihidrochalconas, flavonoles, isoflavonas, flavonas, leucoantocianidinas, antocianinas y proantocianidinas⁶⁰.

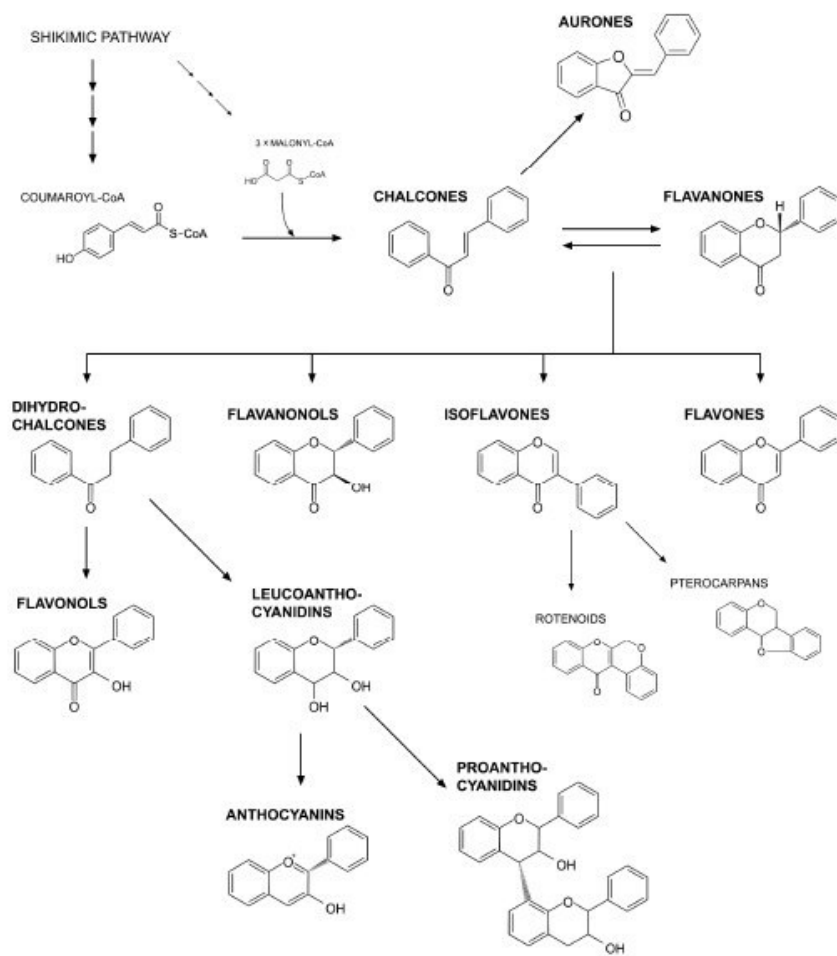


Figura 7. Clasificación de los flavonoides
(Justyna Mierziak et al)⁶⁰

Los flavonoides reducen la producción de las especies reactivas de oxígeno^{61,62} y las reducen mediante:

- Supresión del oxígeno singlete.
- Inhibición de las enzimas generadoras de las especies reactivas de oxígeno (ciclooxigenasa, lipoxigenasa, monooxigenasa, xantina oxidasa).
- Quelación de metales.
- Reduce las cascadas de las reacciones de producción de radicales libres en la oxidación lipídica.
- Reciclaje de otros antioxidantes.

Debido a su bajo potencial redox, los flavonoides pueden reducir radicales radicales fuertes (superóxidos, radicales alquilo, radicales hidroxilo).

2.5.2 Actividad biológica

La actividad antioxidante de los flavonoides está relacionada a la estructura de la molécula, la presencia de enlaces dobles conjugados y la presencia de grupos funcionales en los anillos⁶³.

Los flavonoides han demostrado tener un efecto hipolipidémico^{64,65,66}, pueden suprimir el crecimiento tumoral/metástasis^{67,68}, tienen efecto antiinflamatorio⁶⁸ y actividad neuroprotectora. Tal es el caso de la tangeretina, una metoxiflavona, que posee actividad neuroprotectora^{69,70}; la quercetina, flavonol con actividad antiinflamatoria¹⁰; y que asociada a la desferrioxamina ha manifestado poseer actividad neuroprotectora⁷¹; y la hesperidina, una flavonona, posee efecto neuroprotector⁷² y antiinflamatorio¹¹.

En general, las hidroxiflavonas son conocidas por poseer actividad antioxidante⁷³ y las metoxiflavonas por la actividad neuroprotectora⁷⁴.

2.6 *Zea mays* L.

En el mundo existen diversas variedades de maíz, y estas se caracterizan por presentar varios colores como blanco, amarillo, rojo, morado, marrón, verde y azul. El maíz morado de la variedad *Zea mays* L. tiene su origen en países de Latinoamérica como México, Bolivia y Perú, y fue introducido en numerosos países por los pigmentos que posee.^{75,76} En el Perú estudios revelaron la presencia de la raza ancestral primitiva “Kulli” y la raza incipiente Morado Canteño, así como variedades derivadas de las razas; su cultivo se realiza principalmente en los departamentos de Cajamarca, Ayacucho, Ancash, Lima y Arequipa con semillas

obtenidas en el mercado central de la Parada en Lima, semillas locales obtenidas en mercados o tiendas de la localidad u obtenidas de asociaciones de productores de semillas de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) o del Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA)^{77,78}.

2.6.1 Clasificación taxonómica

El maíz morado pertenece a:

División: Angiospermas

Clase: Monocotiledóneas

Orden: Glumifloras

Familia: Gramineae (Poaceae)

Género: *Zea mays*

2.6.2 Descripción macroscópica de la planta

Zea mays L. es una planta anual, de tallo erguido, nudoso y macizo, entre 1 m a 5 m de altura.⁷⁹ Posee una raíz fibrosa y fasciculada, sus hojas son alternas, lineales o lineal-lanceoladas y largas.⁸⁰

Sus flores son monoicas; las flores masculinas dispuestas en una inflorescencia de tipo panícula miden aproximadamente 30 cm de largo. La inflorescencia femenina es una estructura axilar única, variable en tamaño y forma, llamada mazorca, con varias hojas modificadas que envuelven el grueso eje central sobre el cual se distribuyen las espiguillas en filas.⁸¹ El fruto es una cariósida. La longitud de la mazorca es de aproximadamente 13 cm.⁸²

2.6.3 Composición

Estudios realizados en el maíz morado indican la presencia de antocianinas, tales como cianidina-3-glucósido, pelargonidina-3-glucósido y peonidina-3-glucósido.^{83,84}

Estos compuestos, presentan un alto potencial para su uso como colorantes naturales debido a los colores atractivos naranja, rojo, morado y azul que presentan,⁸⁵⁻⁸⁷ las investigaciones revelan que el color y estabilidad de estos pigmentos antociánicos dependen de varios factores entre los que se encuentran: estructura y concentración del pigmento, pH, temperatura, calidad e intensidad de la luz a los que son sometidos, presencia de copigmentos, iones metálicos, enzimas, oxígeno, ácidos orgánicos con propiedades oxidantes y reductoras, azúcares, productos de degradación, y dióxido de azufre entre otros.^{87,88}

2.6.4 Actividad biológica

El maíz morado (*Zea mays* L.) contiene compuestos fenólicos, como los flavonoides y las antocianinas, que presentan actividad antioxidante y mejoran los perfiles lipídicos, reducen el riesgo de enfermedad cardíaca y aterosclerosis en modelos experimentales de hiperlipidemia.⁸⁹ Así, se demostró que la dieta con maíz morado rico en antocianinas previene la obesidad e hiperglicemia en ratones, además disminuye el ARNm de las enzimas que intervienen en las síntesis de ácidos grasos y triglicéridos.⁹⁰ Otros autores reportaron que las antocianinas impiden el aumento de peso en ratas alimentadas con una dieta rica en grasas, por disminución del tejido adiposo y el contenido de lípidos séricos.⁹¹ En ese sentido, otros estudios demostraron la actividad antioxidante, hipocolesterolémica y antihipertensiva del extracto hidroalcohólico atomizado de maíz morado en animales de experimentación.^{92,93} El estudio realizado con peces cebras hipercolesterolémicos describió que el consumo de las antocianinas muestra propiedades antiateroscleróticas en dichos animales,⁹⁴ así como protección contra la hipercolesterolemia y atenuación de la aterosclerosis en ratones que consumieron una dieta suplementada con antocianinas.⁹⁵

III. PARTE EXPERIMENTAL

El presente trabajo de investigación es un estudio experimental, prospectivo, longitudinal y analítico.

El estudio fitoquímico se realizó en el Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

El estudio de la actividad biológica o farmacológica se realizó en el departamento de farmacología de la Facultad de Medicina de la UNMSM.

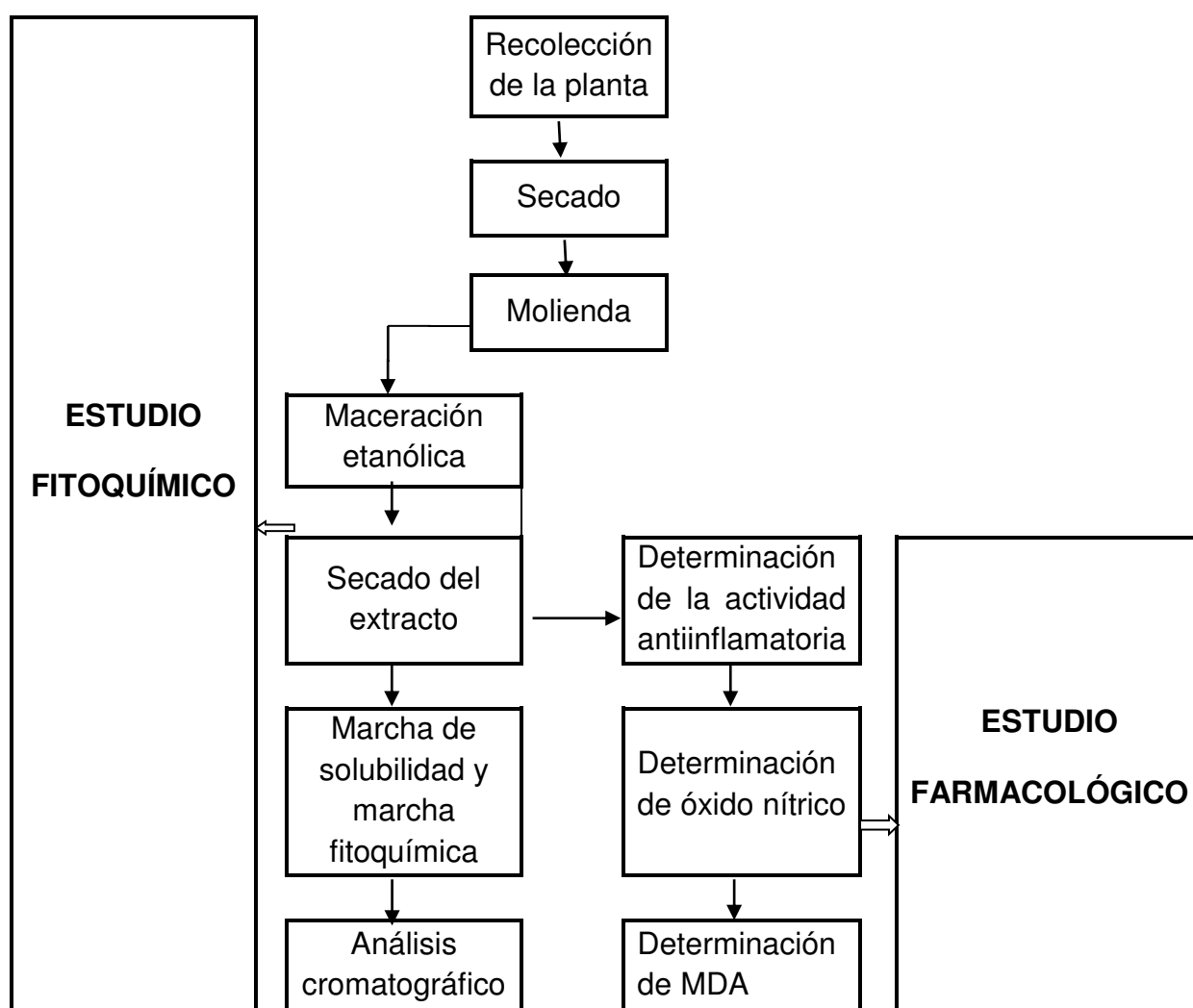


Figura 8. Diagrama del presente trabajo de investigación

3.1 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

3.1.1 Materiales

- Vaso beakers
- Erlenmeyer
- Matraces
- Probetas
- Pipetas
- Tubos de ensayo
- Viales
- Micropipetas
- Cubeta espectrofotométrica
- Cromatoplasmas de sílica gel F60 de 20 cm x 20 cm

3.1.2 Equipos

- Bomba de vacío
- Espectrofotómetro: Espectro UV-VIS Thermoscientific modelo Helios Zeta
- Balanza analítica sensibilidad 0.1 mg, Denver Modelo XP-300
- Lámpara UV 254 nm, 360 nm
- Homogenizador Vortex Mixer. VM300
- Estufa memmert,
- Refrigeradora
- Baño María

3.1.3 Reactivos

- Agua destilada
- Etanol 96%
- Metanol QP
- n- hexano QP
- Cloroformo
- Gelatina

- FeCl_3
- Dragendorff
- Solución de Alsever
- Solución isosalina (0.85 % pH 7.2)
- Solución hiposalina 0.36 %
- Buffer fosfato 0.15 M, pH 7.4
- Hidrocortisona
- Quercetina estándar
- Hesperidina estándar
- HCl 2N
- Ácido sulfanílico
- N-1-naftil-etilendiamidichlorhidrato al 0.1 % en agua.
- Ácido tricloroacético al 20 %
- Ácido tiobarbitúrico al 0.67 % en HCl 0.25 N

3.2 MÉTODOS

Con el fin de determinar los tipos de metabolitos secundarios tales como los compuestos fenólicos presentes en el extracto de *Zea mays* L. y su actividad biológica se realizaron los siguientes estudios:

a. Estudio fitoquímico

- Marcha de solubilidad y marcha fitoquímica
- Análisis cromatográfico
- Análisis estructural

b. Estudio farmacológico

- Determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* mediante la estabilización de la membrana de glóbulos rojos.

- Determinación del marcador del estrés oxidativo: óxido nítrico (NO) (Actividad antioxidante)
- Determinación del marcador del estrés oxidativo: malondialdehído (MDA) (Actividad antioxidante).

3.3 FUNDAMENTO

3.3.1 Estudio fitoquímico

3.3.1.1 *Marcha de solubilidad y marcha fitoquímica*

3.3.1.1.1 Marcha de solubilidad

Este ensayo se basa en la utilización de diferentes solventes de polaridad creciente y el grado de disolución.

3.3.1.1.2 Marcha fitoquímica

Se fundamenta en reacciones de coloración y precipitación características de los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de la especie vegetal.

- Reacción con Gelatina/NaCl

Los taninos precipitan las proteínas en solución.

Un precipitado blanquecino abundante indica la presencia de taninos.

- Reacción con FeCl₃

Es característica para compuestos fenólicos. Se evidencia mediante coloraciones verdes a marrón para derivados de catecol, y coloraciones azuladas para derivados de pirogalol.

- Reacción de Dragendorff (Ioduro de Bismuto y Potasio)

La formación de un precipitado o coloración rojo anaranjado, indica la presencia de un compuesto nitrogenado, por ejemplo alcaloides.

- **Reacción de Shinoda**

En un tubo de ensayo se deposita una solución poco coloreada del extracto vegetal, se agregan pequeños trozos de Mg metálico y gotas de HCl concentrado.

El magnesio metálico reacciona con el HCl cc. El hidrógeno generado produce por reducción el ión flavilio de color rojo escarlata. Las coloraciones formadas varían del rosado claro a un tono de rojo a excepción de las chalconas, isoflavonas, auronas quienes dan una reacción negativa.

3.3.1.2 Análisis cromatográfico

El análisis cromatográfico permite identificar los metabolitos presentes en el extracto a analizar. La separación de los compuestos se lleva a cabo según su polaridad y de acuerdo a la solubilidad en el sistema de solventes.

3.3.1.3 Análisis estructural

A partir de los datos obtenidos en la marcha fitoquímica y en el análisis cromatográfico, una estructura puede ser propuesta.

3.3.2 Estudio farmacológico

3.3.2.1 Determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* mediante la estabilización de la membrana de glóbulos rojos

La determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* se realizó siguiendo el método de Arroyo et al, 2004⁹⁶.

La determinación de la actividad antiinflamatoria *in vitro* está basada en la inducción a la hemólisis de la solución hiposalina.

Se considera que con el agua destilada se logra 100 % de hemólisis.

3.3.2.2 Determinación del marcador del estrés oxidativo, óxido nítrico (Actividad antioxidante)

La determinación de la actividad antioxidante mediante la cuantificación del óxido nítrico (NO) se llevó a cabo según el método de la reacción de Griess⁹⁷ modificada.

El óxido nítrico puede ser medido directamente en la circulación sanguínea; sin embargo, el NO endógeno en el estado basal tiene una vida media que es inferior a 0.1 s aproximadamente. En cambio, los nitritos y nitratos son metabolitos estables del NO, los cuales se presentan en la sangre y en la orina, por lo que pueden ser fácilmente cuantificados.

La determinación cuantitativa de la concentración de los nitritos y nitratos en fluidos biológicos, principalmente en el plasma, suero y orina, es el método más conveniente para cuantificar la síntesis de NO *in vivo*. El método más frecuente utilizado para cuantificar nitritos y nitratos está basado en la reacción de Griess.

La reacción de Griess está fundamentada en la diazotización. Primero, este método requiere que el NO_3^- sea reducido en NO_2^- . Luego, NO_2^- reacciona con el ácido sulfanílico bajo condiciones ácidas para formar un ion diazonio que se acopla con el α -naftil amina que forma a su vez, un complejo cromóforo azo. También es posible utilizar otros derivados de los reactivos originales de la reacción de Griess como la sulfanilamida y el N-(1-Naftil)-etilendiamina.⁹⁷

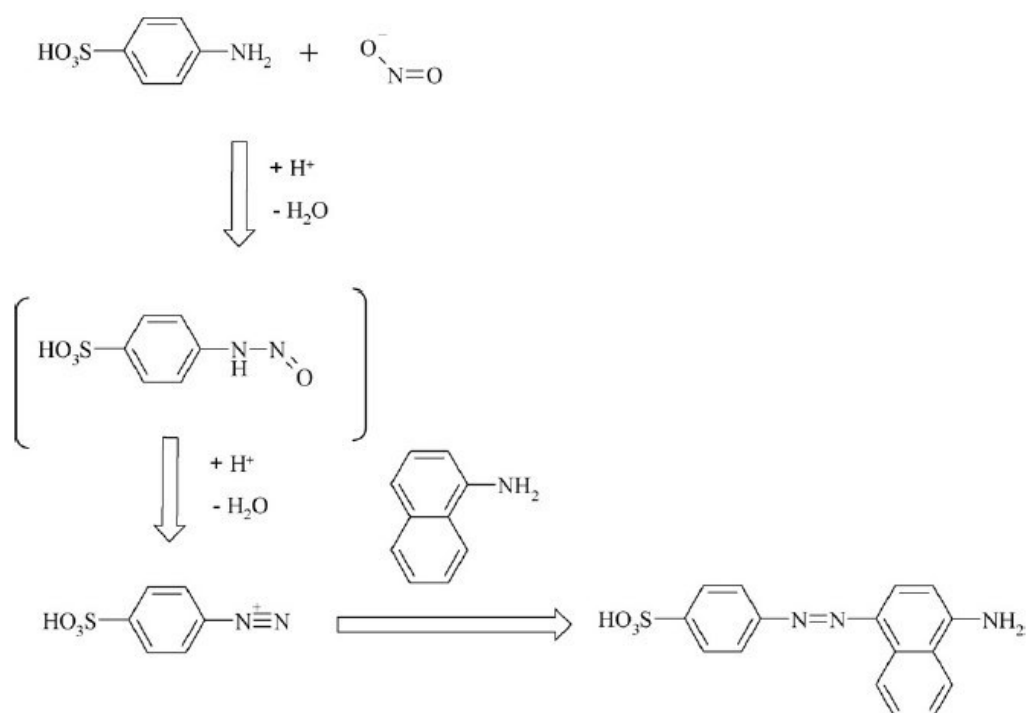


Figura 9. Diagrama esquemático representando el principio de la reacción de Griess original
(Dimitrios Tsikas)⁹⁷

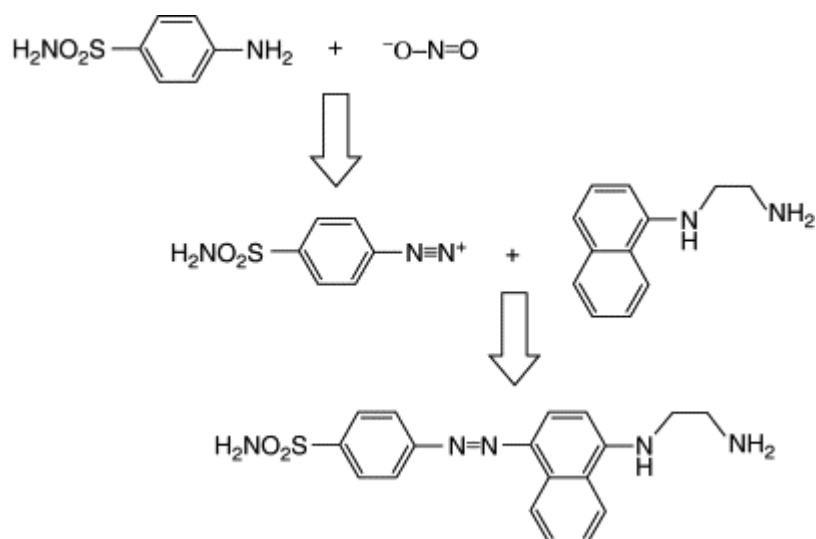


Figura 10. Diagrama esquemático representando el principio de la reacción de Griess modificada
(Dimitrios Tsikas)⁹⁷

3.3.2.3 Determinación del marcador del estrés oxidativo, malondialdehído (Actividad antioxidante)

La determinación de la actividad antioxidante mediante la cuantificación del malondialdehído (MDA) se realizó según el método de Buege J, Aust, 1978 ⁹⁸ y Ohkawa H et al, 1979 ⁹⁹.

El criterio más común usado para la evaluación del estrés oxidativo está basado en la determinación de las concentraciones de los productos de oxidación lipídica en los fluidos del organismo.

La evaluación del estrés oxidativo se lleva a cabo mediante la cuantificación de uno de los productos finales de la peroxidación lipídica, el malondialdehído (MDA) ya que a diferencia de los otros productos de degradación, el MDA es un producto relativamente estable siendo su determinación fácil y reproducible.

Esta reacción se fundamenta en la capacidad del MDA para reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para un complejo MDA-TBA que puede ser cuantificado espectroscópicamente.

A todo lo expuesto, se suma el hecho que el malondialdehído se encuentra incrementado en pacientes con la enfermedad de Parkinson.⁸

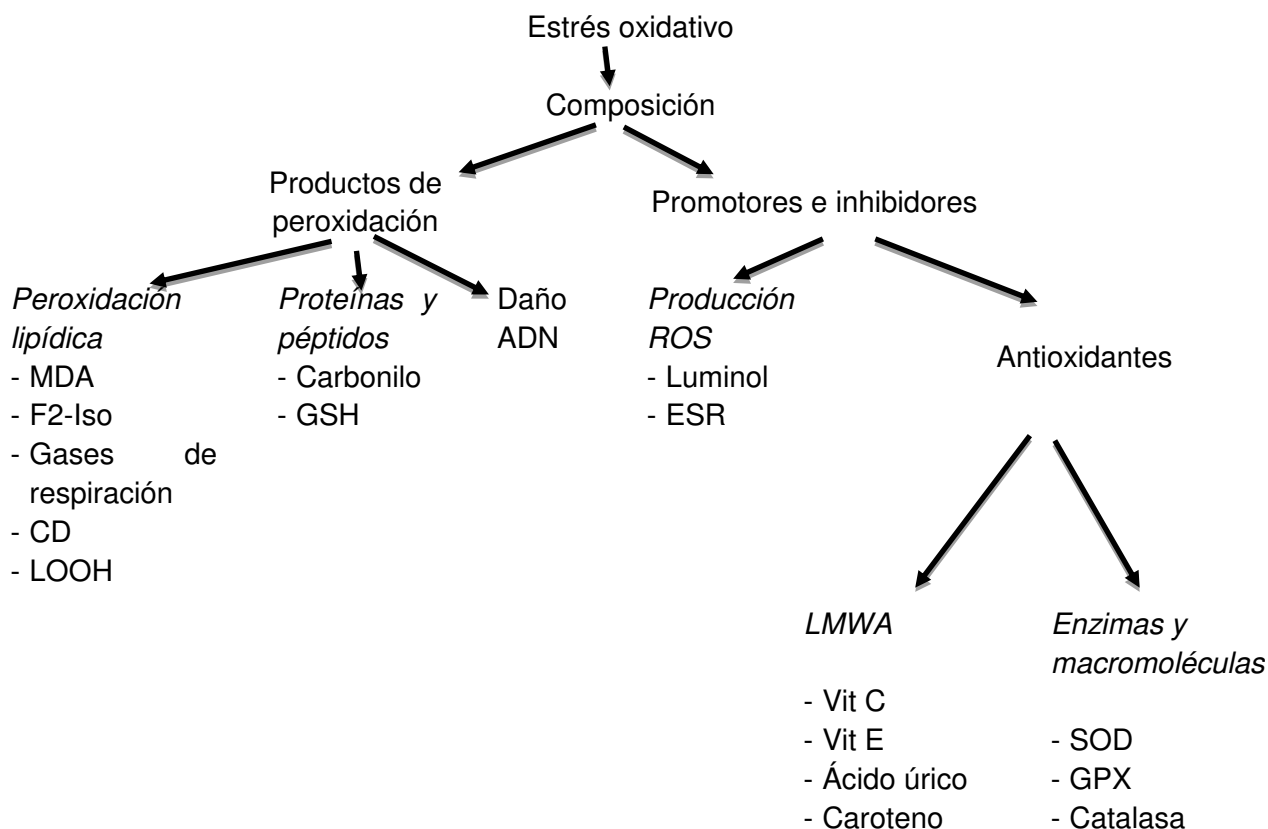


Figura 11. Métodos usados para la evaluación del estrés oxidativo
(LMWA, antioxidantes de bajo peso molecular)²⁸

3.4 PROCEDIMIENTO

3.4.1 Estudio fitoquímico

3.4.1.1 Preparación de la muestra

El material recolectado proveniente de cañete fue acondicionado y estabilizado en un ambiente a temperatura de 32°C aproximadamente por 7 días con el fin de secar la planta. Terminado el proceso de secado se sometió a un proceso de reducción de tamaño manualmente para preparar el extracto etanólico.

3.4.1.2 Preparación del extracto

El tipo de extracción utilizado fue el método de maceración alcohólica durante 7 días.

En un envase de vidrio ámbar de 4 litros de capacidad se colocó en su interior 450 g de polvo de corontas de *Zea mays* L. Luego se añadió 2 litros de alcohol etílico rectificado de 96° hasta que cubrió por completo el contenido del polvo. A continuación se agitó dos veces por día durante 7 días (tiempo de maceración). Después de los 7 días de maceración se filtró utilizando fibra de vidrio. Ulteriormente se procedió a la evaporación del contenido etanólico del filtrado en un horno a 40 °C, obteniéndose de esta manera un extracto seco de las corontas de *Zea mays* L.

3.4.1.3 Marcha de solubilidad y marcha fitoquímica

3.4.1.3.1 Marcha de solubilidad

Disolver aproximadamente 5 mg de extracto de *Zea mays* L. en .1 mL de diferentes solventes de polaridad creciente y anotar el grado de disolución.

3.4.1.3.2 Marcha fitoquímica

Disolver 100 mg del extracto etanólico en 10 mL de metanol y realizar las reacciones de coloración y precipitación en alícuotas de 0.5 mL.

- Reacción con Gelatina/NaCl

A una alícuota de 0.5 mL de solución de extracto y agregar 2 a 3 gotas del reactivo Gelatina/NaCl. Si la reacción es positiva para taninos se formará un precipitado blanquecino abundante.

- **Reacción con FeCl₃**

A una alícuota de 0.5 mL de solución de extracto y agregar 2 a 3 gotas del reactivo FeCl₃. Se formarán coloraciones verdes a marrón o coloraciones azuladas, si la reacción es positiva para compuestos fenólicos.

- **Reacción de Dragendorff (Yoduro de Bismuto y Potasio)**

A una alícuota de 0.5 mL de solución de extracto y agregar 2 a 3 gotas del reactivo de Dragendorff. Se visualizará la formación de un precipitado o coloración rojo anaranjado, de ser positivo para alcaloides.

- **Reacción de Shinoda**

En un tubo de ensayo se deposita una alícuota de 0.5 mL de solución del extracto vegetal, se agregan pequeños trozos de Mg metálico y gotas de HCl concentrado, una reacción positiva para flavonoides indicará presencia de coloración que va del rosado claro al rojo intenso.

3.4.1.4 Análisis cromatográfico

- **Cromatografía en Capa Fina Analítica**

Los compuestos del extracto se analizaron mediante Cromatografía en Capa Fina Analítica, usando como fase fija cromatoplasmas de sílica gel F60 de 20 cm x 20 cm, de 2 mm de espesor. Como fase móvil mezcla de solventes cloroformo/metanol 4:1, revelando las placas con reactivo de tricloruro de hierro, con luz UV de 254 nm y 366 nm.

A continuación, se identificarán las fracciones y se separarán en componentes individuales para su posterior evaluación espectrofotométrica (rango 200 – 400 nm).

3.4.1.5 Análisis estructural

Se realizó la desorción de los componentes aislados del extracto hidroalcohólico de *Zea mays L.*, fueron analizados mediante espectroscopía UV, en un rango de 200-400 nm usando el equipo Thermoscientific modelo Helios Zeta y el programa Vision lite, en el Centro de Producción Farmacéutica (CENPROFARMA) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, y luego comparados con los resultados publicados por Mabry T. *et al* (1970).¹⁰⁰

3.4.2 Estudio farmacológico

3.4.2.1 Determinación de la actividad antiinflamatoria in vitro mediante la estabilización de la membrana de glóbulos rojos

3.4.2.1.1 Procedimiento

Se colecta la sangre de una rata macho normal y se mezcla con igual volumen de solución de Alsever estéril.

Se centrifuga a 3 000 rpm, y se lava el centrifugado con solución isosalina para obtener una solución de glóbulos rojos.

Luego, se mezcla las fracciones del extracto a ensayar a diferentes concentraciones (10; 50; 100; 200 µg/mL), con 1 mL de buffer fosfato, 2 mL de solución hiposalina y 0.5 mL de la suspensión de glóbulos rojos. Como fármaco de referencia, se utiliza la hidrocortisona.

En otro tubo, se reemplazan los 2 mL de solución hiposalina por agua destilada en la mezcla anterior para preparar el control.

Se incuban todos los tubos a 37 °C durante 30 minutos. Retirar y centrifugar.

La hemoglobina contenida en la solución sobrenadante será estimada con el espectrofotómetro a 560 nm.

El indicador será el porcentaje de hemólisis, el cual es calculado asumiendo que la hemólisis producida por el agua destilada es 100%.

El porcentaje de protección de la membrana de glóbulos rojos es calculada usando:

$$\% \text{ de protección} = 100 - \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} \times 100$$

3.4.2.1.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue elaborado empleando el análisis de varianza (test de Levene) y el análisis de medias (test t) usando el programa Graph pad. Un valor de $p < 0.05\%$ fue considerado como estadísticamente significativo.

3.4.2.2 Determinación del marcador del estrés oxidativo, óxido nítrico(Actividad antioxidante)

3.4.2.2.1 Procedimiento

Se homogeneiza el suero de la sangre con HCl 2N. Luego, se centrifuga a 6 000 g durante 10 minutos con ácido sulfanílico. Se añade 1 mL N-1-naftil-etilendiamida y se lleva a incubación durante 30 minutos.

Se lee con absorbancia 548 nm en espectrofotómetro.

3.4.2.2.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue elaborado empleando el test de Kruskal-Wallis usando el programa Graph pad. Un valor de $p < 0.05\%$ fue considerado como estadísticamente significativo.

3.4.2.3 *Determinación del marcador del estrés oxidativo, malondialdehído (Actividad antioxidante)*

3.4.2.3.1 Procedimiento

Se coloca en un tubo de ensayo 0.3 mL de suero y 0.6 de ácido tricloroacético al 20 %. Tapar el tubo y mezclar.

A continuación, se lleva a baño María hirviendo durante 10 minutos, se enfría y se añade 0.9 mL de ácido tiobarbitúrico al 0.67 % en HCl 0.25 N. Mezclar.

Luego, se lleva nuevamente a baño María hirviendo por 30 minutos y se enfría con agua helada.

Centrifugar a 4 000 rpm durante 10 minutos.

Separar el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur y llevarlo a lectura en el espectrofotómetro a 535 nm.

Para calcular la concentración de MDA se utilizó el coeficiente de extinción molar $1.56 \times 10^5 \text{ mmol}\cdot\text{cm}^{-1}$ del complejo coloreado formado por el malondialdehído-tiobarbitúrico.

3.4.2.3.2 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue hecho empleando el test de Kruskal-Wallis usando el programa Graph pad. Un valor de $p < 0.05\%$ fue considerado como estadísticamente significativo.

IV. RESULTADOS

4.1 ESTUDIO FITOQUÍMICO

4.1.1 Obtención de la muestra

Al finalizar el proceso de secado de la muestra en estudio se obtuvieron las corontas secas pulverizadas de *Zea mays* L.

4.1.2 Obtención del extracto

Se obtuvo un extracto de consistencia pastosa y de color morado oscuro.

4.1.3 Marcha de solubilidad y marcha fitoquímica

4.1.3.1 Marcha de solubilidad

Los resultados obtenidos en la marcha de solubilidad con diferentes solventes de diferente polaridad se encuentran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Resultados del ensayo de solubilidad del extracto etanólico de *Zea mays* L.

Solventes	Resultado
n- hexano	-
Cloroformo	-
Etanol	+++
Metanol	+++
Agua	++

Leyenda:

Insoluble (-)

Soluble (++)

Muy soluble (+++)

4.1.3.2 *Marcha fitoquímica*

Los resultados obtenidos para este ensayo se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de la marcha fitoquímica del extracto etanólico de *Zea mays* L.

Pruebas	Metabolito secundario	Resultado
Reactivo de Gelatina	Taninos	-
Reactivo de FeCl ₃	Compuestos fenólicos	+++
Reactivo de Dragendorff	Alcaloides	-
Reactivo de Shinoda	Flavonoides	++

Leyenda:

Abundante: + + +

Cantidades pequeñas: ++

Reacción negativa: -

4.1.4 **Análisis cromatográfico**

Los metabolitos secundarios presentes en el extracto de *Zea mays* L fueron analizados a través de cromatografía en capa fina, visualizados mediante el revelado con FeCl₃, a la luz UV a 254 nm y 366 nm. Se identificaron 10 fracciones, como se muestra en la figura 14.

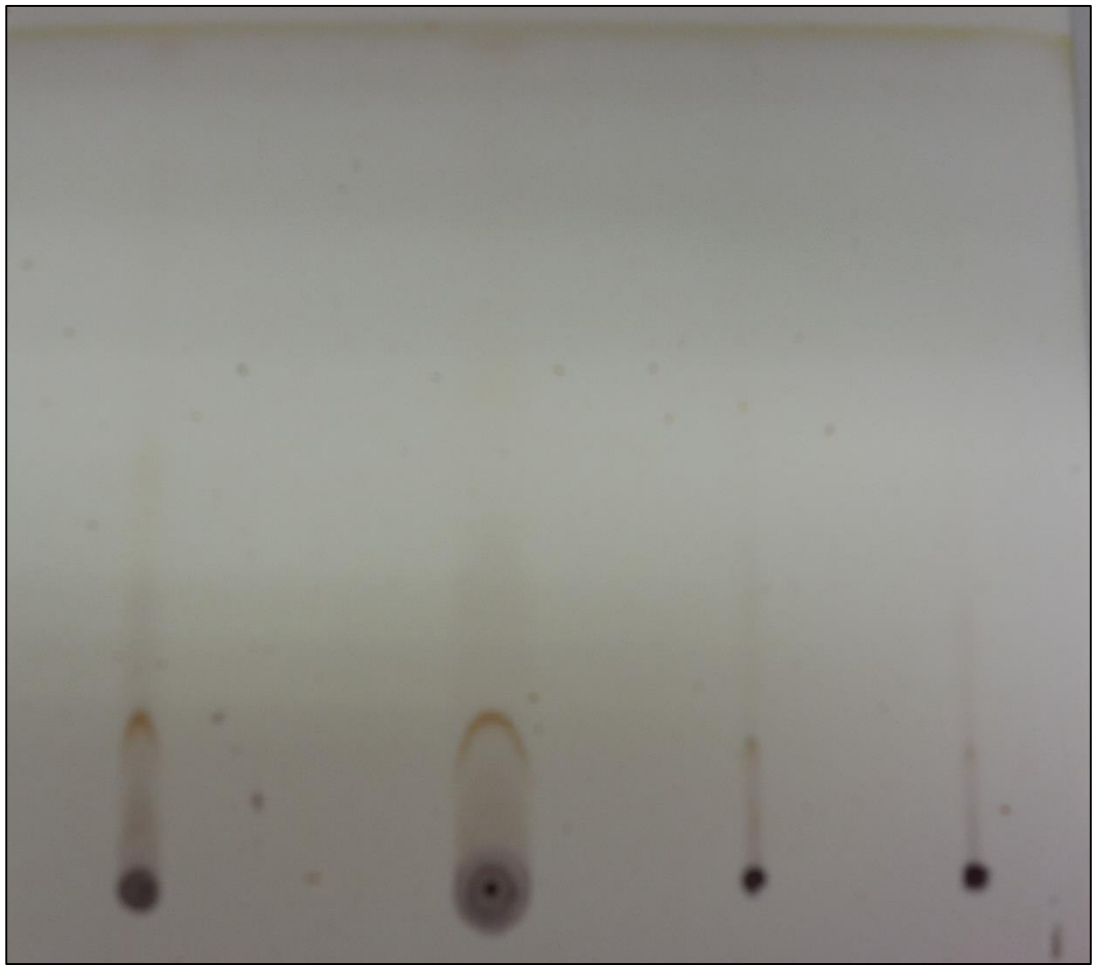


Figura 12. Cromatograma en capa fina del extracto de *Zea mays* L. revelada con FeCl_3

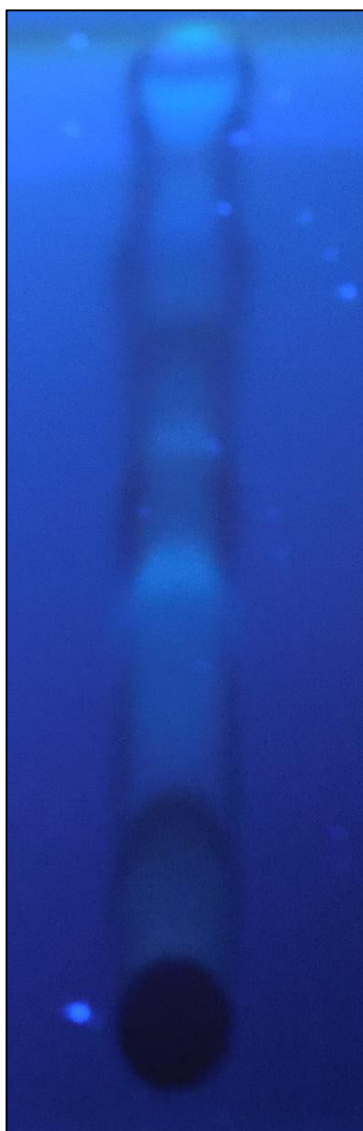


Figura 13.Cromatograma en capa fina del extracto de *Zea mays*L. revelado con luz UV 254 nm

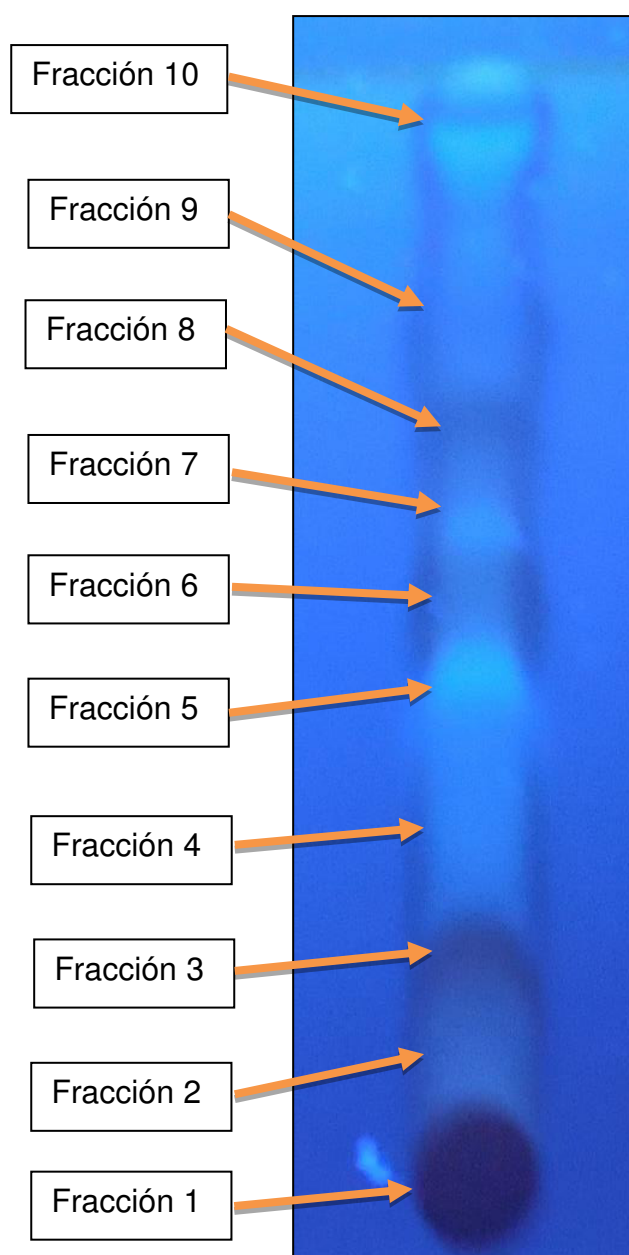


Figura 14.Cromatograma en capa fina del extracto de *Zea mays* L. revelado con luz UV 366 nm

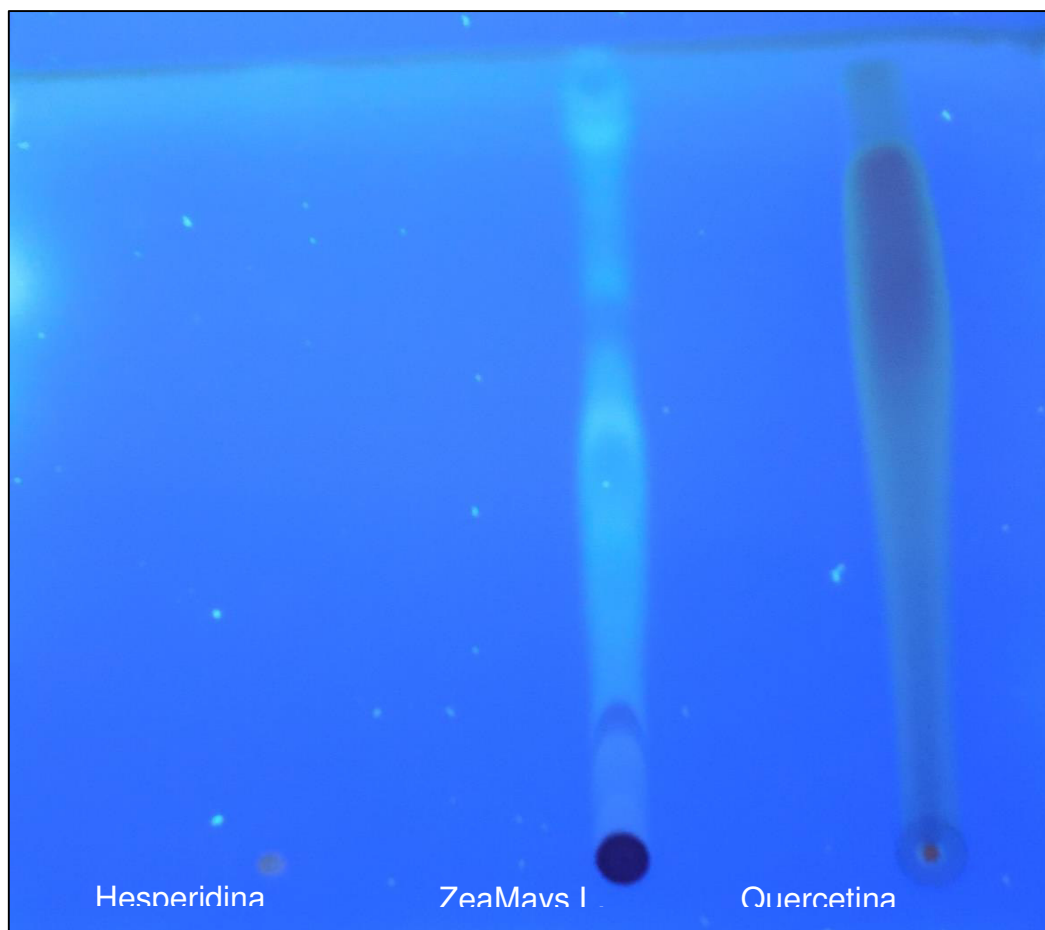


Figura 15.Cromatograma en capa fina de hesperidina, extracto de *Zea mays* L. y quercetina revelada con luz UV 366 nm.

4.1.5 Análisis estructural

4.1.5.1 Espectros ultravioleta de las fracciones analizadas

Los espectros ultravioleta obtenidos a partir de las 10 fracciones analizadas se muestran a continuación.

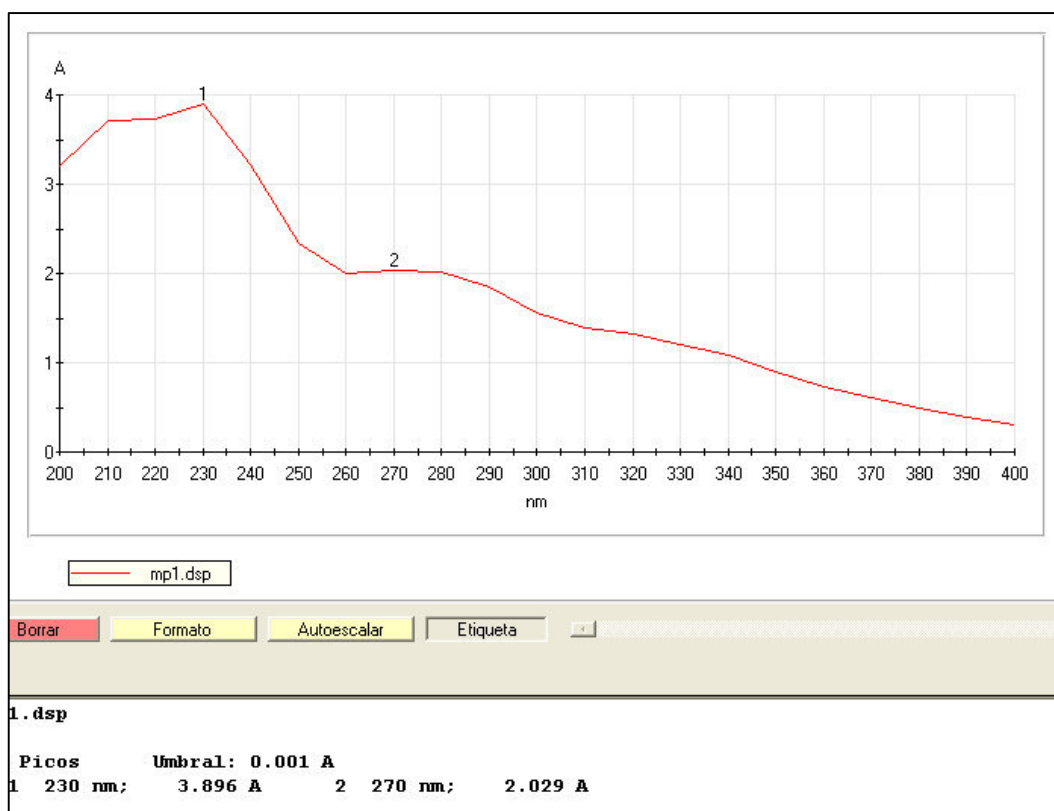


Figura 16. Espectro UV de la fracción 1

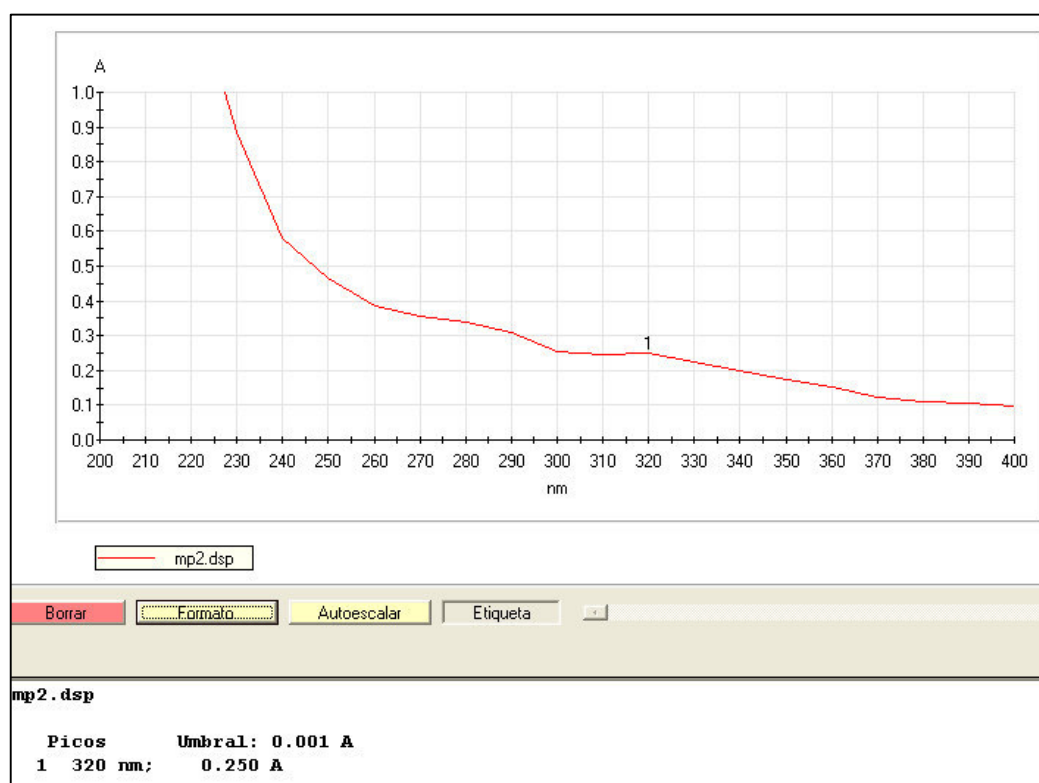


Figura 17. Espectro UV de la fracción 2

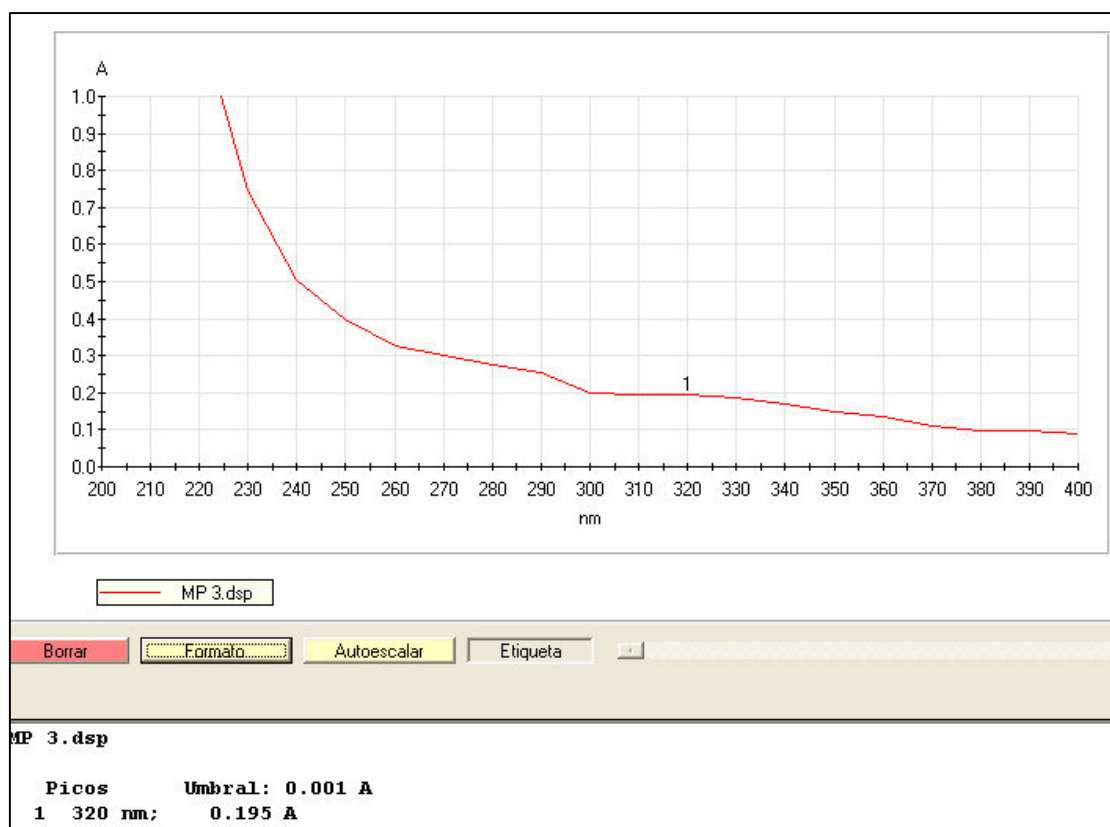


Figura 18. Espectro UV de la fracción 3

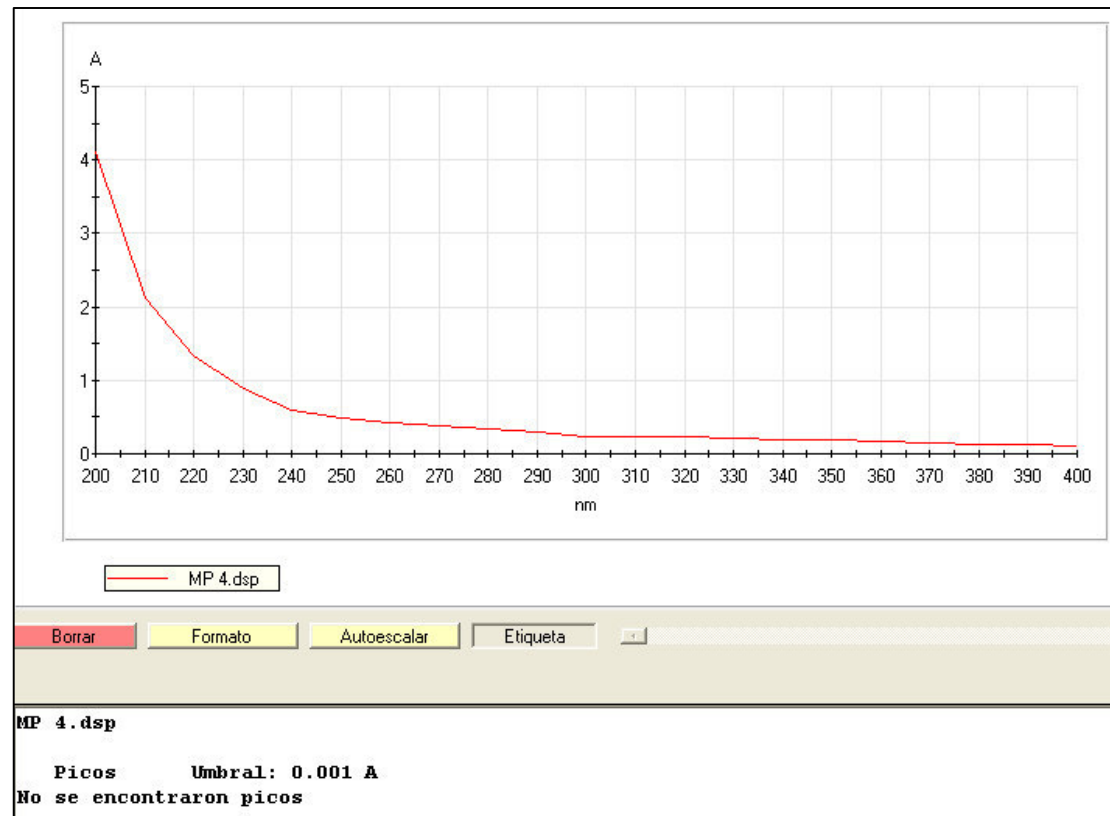


Figura 19. Espectro UV de la fracción 4

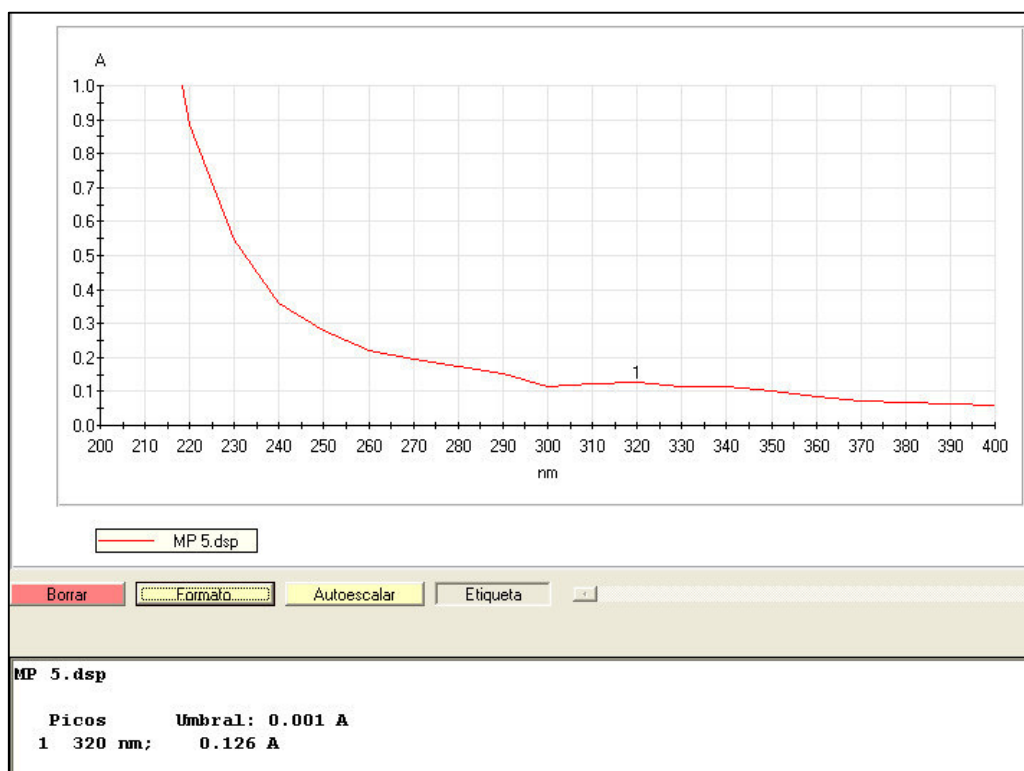


Figura 20. Espectro UV de la fracción 5

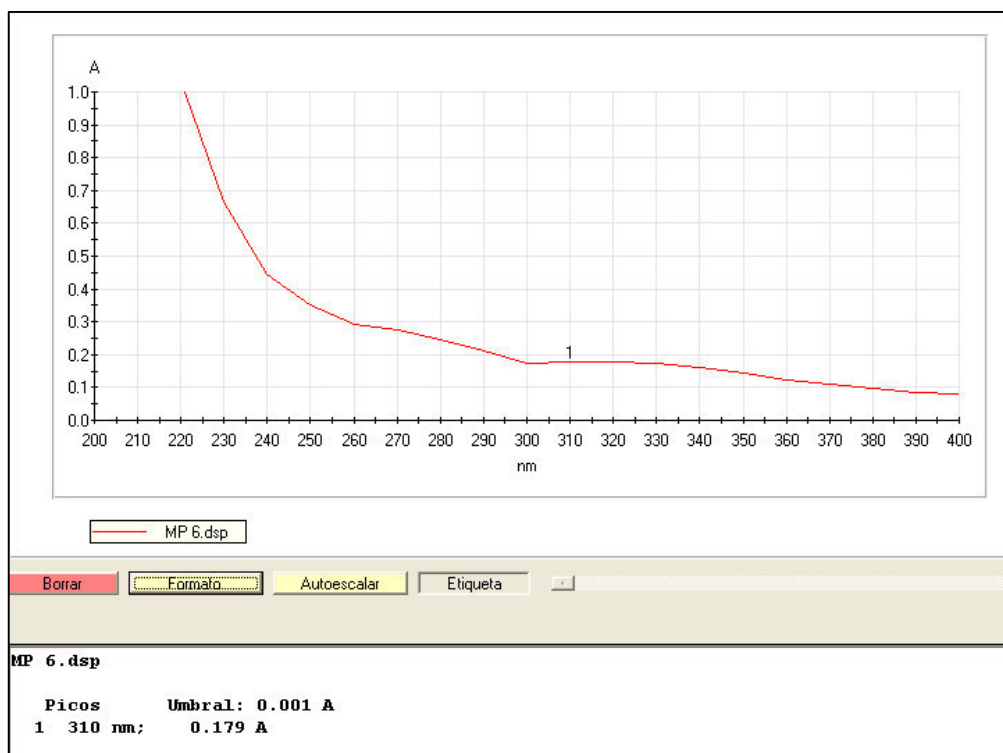


Figura 21. Espectro UV de la fracción 6

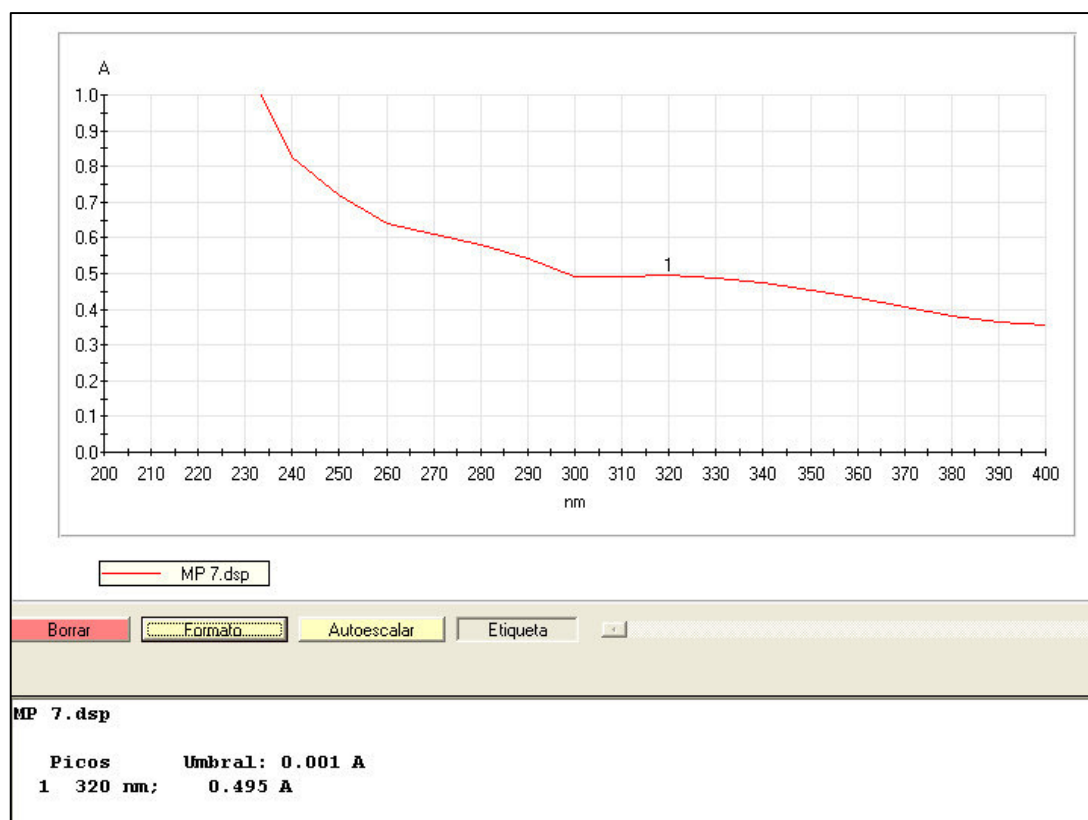


Figura 22. Espectro UV de la fracción 7

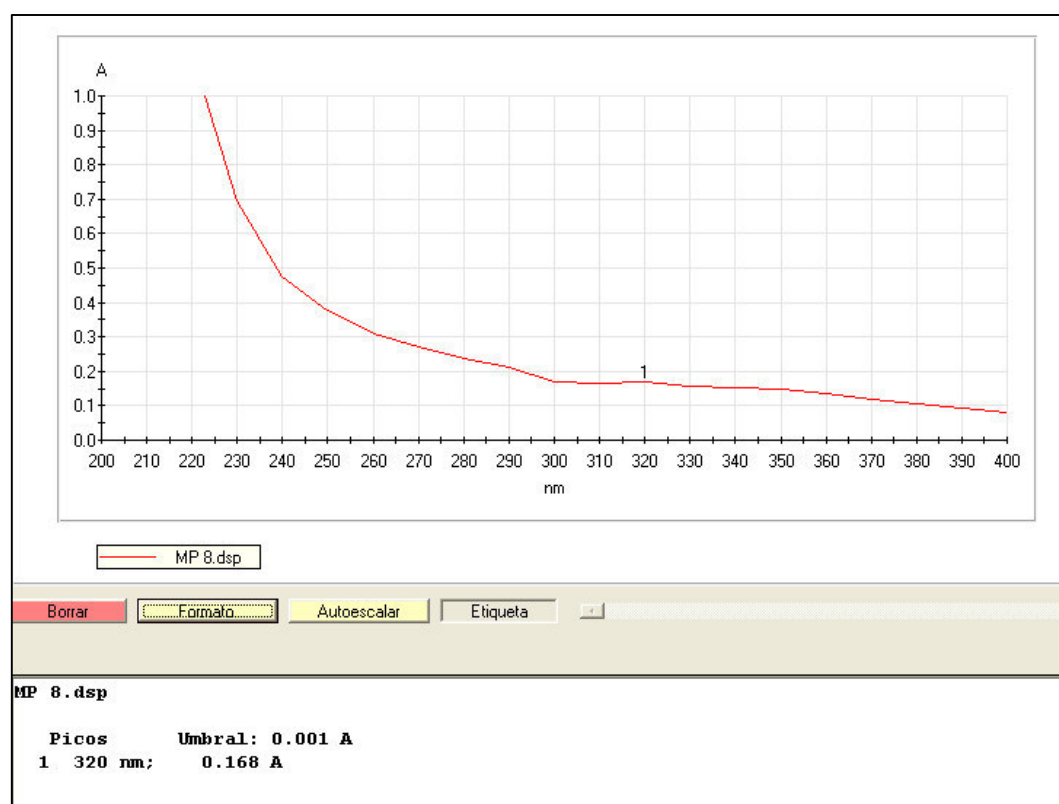


Figura 23. Espectro UV de la fracción 8

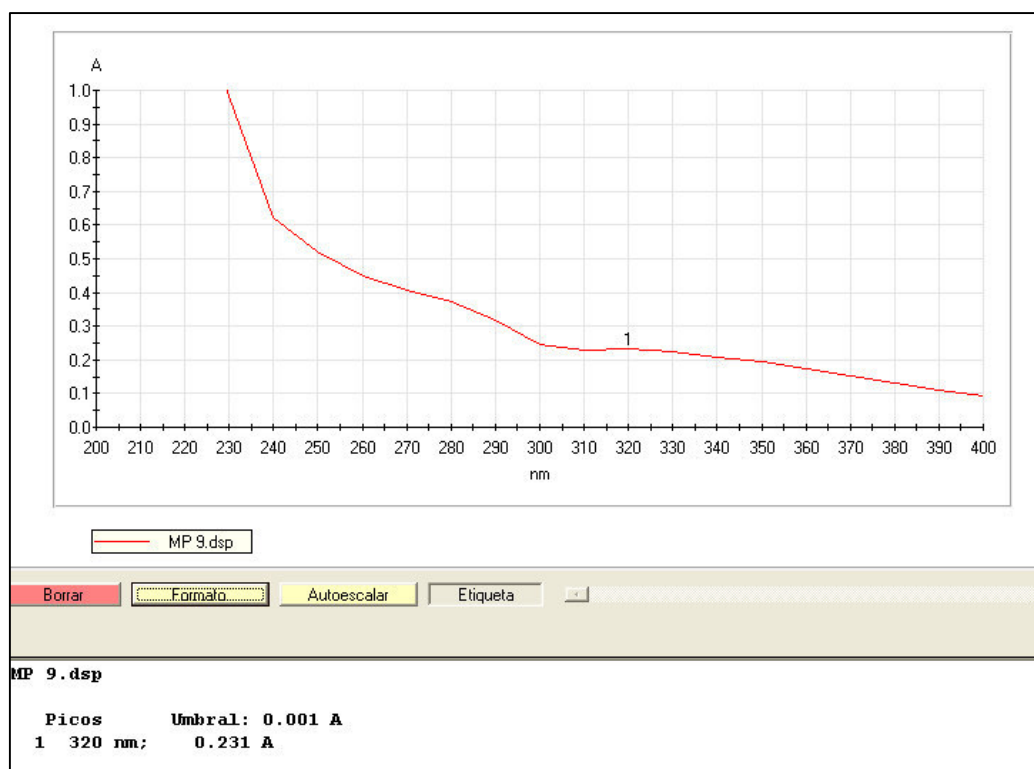


Figura 24. Espectro UV de la fracción 9

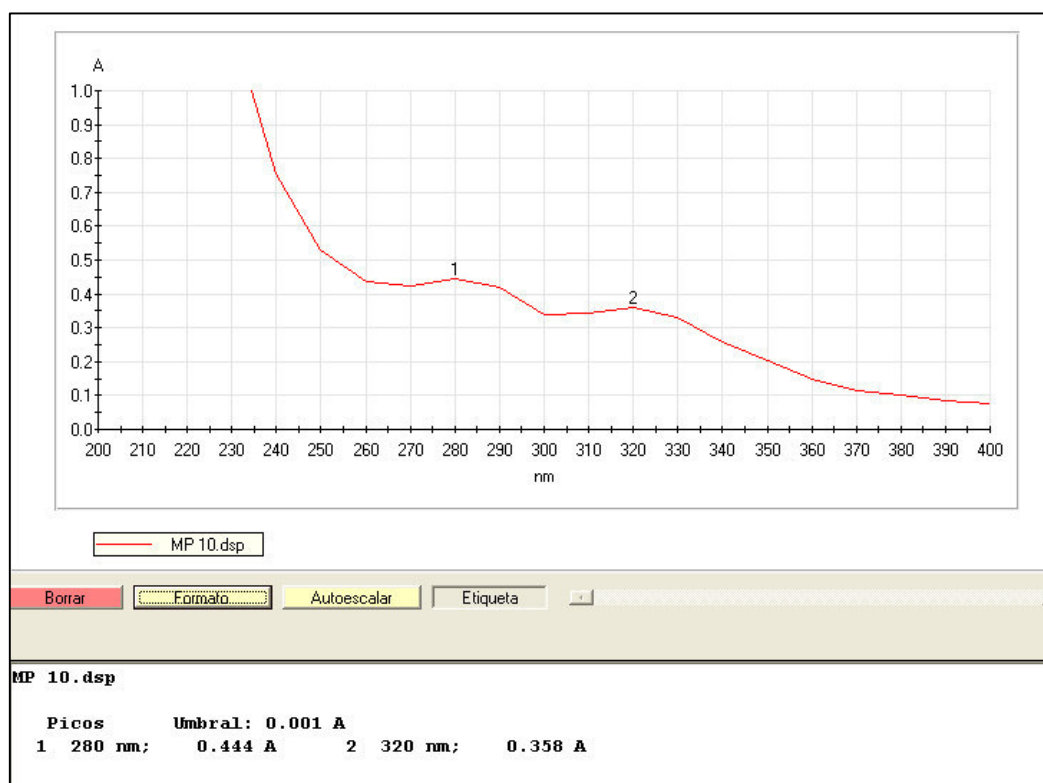


Figura 25. Espectro UV de la fracción 10

4.1.5.2 Estructuras propuestas

Luego de analizar los espectros ultravioleta correspondientes a las 10 fracciones, se proponen las siguientes estructuras.

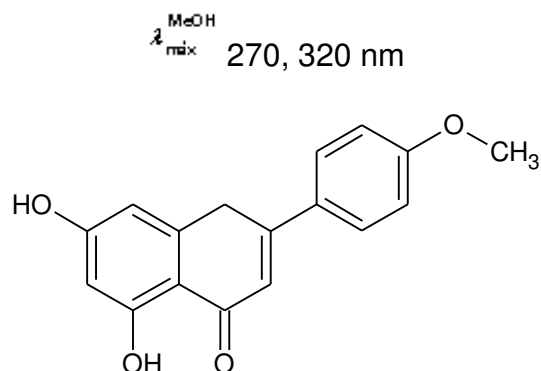


Figura 26. Estructura del 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona perteneciente a la fracción 1

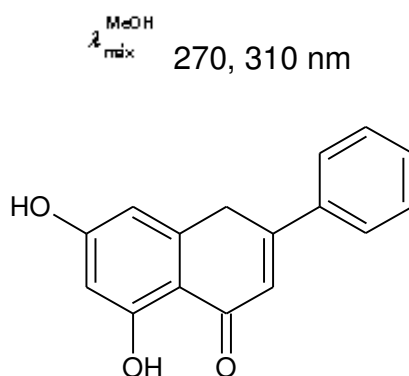


Figura 27. Estructura del 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona perteneciente a la fracción 6

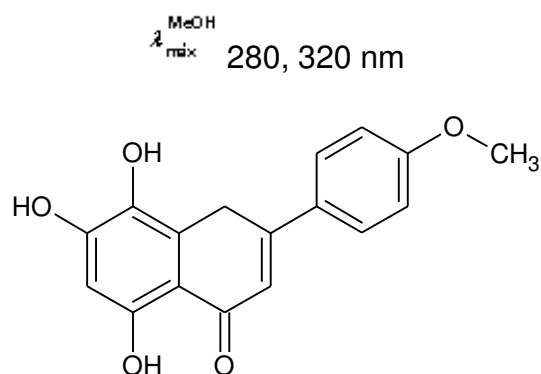


Figura 28. Estructura del 5,7,8-trihidroxi-4'-metoxiflavona perteneciente a la fracción 10

4.2 ESTUDIO FARMACOLÓGICO

4.2.1 Determinación de la actividad antiinflamatoria mediante la estabilización de la membrana de glóbulos rojos de ratas normales

4.2.1.1 Protección de la membrana de glóbulos rojos

Tabla 4. Datos de la actividad antiinflamatoria *in vitro* del extracto etanólico de *Zea mays* L.

Tratamiento	% de Protección	% de Hemólisis
Agua destilada	0 %	100 %
<i>Zea mays</i> L. (10 µg/mL)	50.37	49.63
<i>Zea mays</i> L. (50 µg/mL)	53.33	46.67
<i>Zea mays</i> L. (100 µg/mL)	55.56	44.44
<i>Zea mays</i> L. (200 µg/mL)	37.04	62.96
Hidrocortisona (10 µg/mL)	65.19	34.81
Hidrocortisona (50 µg/mL)	43.21	56.79
Hidrocortisona (100 µg/mL)	62.96	37.04
Hidrocortisona (200 µg/mL)	67.41	32.59
Quercetina (10 µg/mL)	68.40	31.6
Quercetina (50 µg/mL)	61.23	38.77
Quercetina (100 µg/mL)	51.11	48.89
Quercetina (200 µg/mL)	40.74	59.26
Hesperidina (10 µg/mL)	63.21	36.79
Hesperidina (50 µg/mL)	61.48	38.52
Hesperidina (100 µg/mL)	60.74	39.26
Hesperidina (200 µg/mL)	62.72	37.28

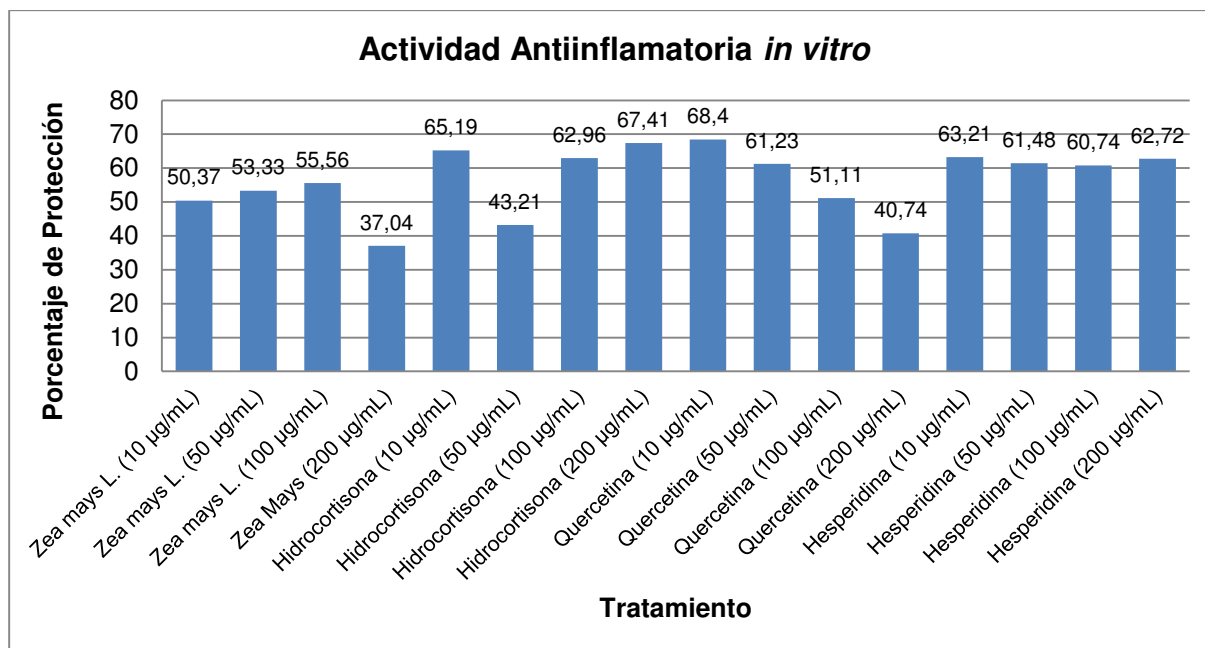


Figura 29. Actividad antiinflamatoria *in vitro* del extracto etanólico de *Zea mays* L. comparado con los flavonoides quercetina y hesperidina, así como hidrocortisona

4.2.1.2 Análisis estadístico

4.2.1.2.1 Distribución normal

La comprobación de la normalidad de la variable es imprescindible antes de utilizar un test estadístico paramétrico.

La normalidad de las variables fue comprobada mediante el test de Shapiro-Wilk.

H_0 : La variable de la cual proviene la muestra sigue una distribución normal

H_a : La variable de la cual proviene la muestra no sigue una distribución normal

- Variable: *Zea mays* L.

P -valor	0.212
α	0.05

Dado que el valor de p es superior al nivel de significación $\alpha = 0.05$, la variable de la cual proviene la muestra sigue la distribución normal.

- Variable: Hidrocortisona

p-valor	0.067
α	0.05

Dado que el valor de p es superior al nivel de significación $\alpha = 0.05$, la variable de la cual proviene la muestra sigue la distribución normal.

- Variable: Quercetina

p-valor	0.910
α	0.05

Dado que el valor de p es superior al nivel de significación $\alpha = 0.05$, la variable de la cual proviene la muestra sigue la distribución normal.

- Variable: Hesperidina

p-valor	0.686
α	0.05

Dado que el valor de p es superior al nivel de significación $\alpha = 0.05$, la variable de la cual proviene la muestra sigue la distribución normal.

En síntesis, todas las variables siguen una distribución normal lo que permite la utilización de un test paramétrico como el análisis de varianza

Tabla5. Test de Shapiro-Wilk

Variable	p-valor
<i>Zeamays L.</i>	0.212
Hidrocortisona	0.067
Quercetina	0.910
Hesperidina	0.686

4.2.1.2.2 Análisis de varianza

Para analizar las varianzas de todas las variables, se utilizó el test de Levene para:

H_0 : Las varianzas son idénticas.

H_1 : Al menos una de las varianzas es diferente.

Tabla 6. Test de Levene

Análisis	Valor
F (Valorobservado)	2.809
F (Valorcrítico)	3.490
p-valor	0.085
α	0.05

El valor de p calculado es superior al nivel de significación $\alpha = 0.05$, lo que significa que las varianzas de todas las variables analizadas son idénticas.

Las varianzas siendo idénticas, es posible emplear el test de análisis de medias.

4.2.1.2.3 Análisis de las medias

Para analizar las medias de dos muestras independientes se empleó el test-T.

H_0 : La diferencia entre las medias es igual a cero.

H_1 : La diferencia entre las medias es diferente de cero.

- *Zea mays* L. vs hidrocortisona

El intervalo de confianza al 95 % alrededor de la diferencia de las medias es:

] -27.616; 6.381[

Tabla 7. Test t de *Zea mays* L. vs hidrocortisona

Análisis	Valor
t (Valor observado)	-1.529
t (Valor crítico)	2.448
p-valor	0.177
α	0.05

Dado que el valor de p es superior al nivel de significación $\alpha = 0.05$, la diferencia entre las medias es igual a cero.

- *Zea mays* L. vs quercetina

El intervalo de confianza al 95 % alrededor de la diferencia de las medias es:

$$] -24.211; 11.621[$$

Tabla 8. Test t de *Zea mays* L. vs quercetina

Análisis	Valor
t (Valor observado)	-0.860
t (Valor crítico)	2.448
p-valor	0.423
α	0.05

Dado que el valor de p es superior al nivel de significación $\alpha = 0.05$, la diferencia entre las medias es igual a cero.

- *Zea mays* L. vs hesperidina

El intervalo de confianza al 95 % alrededor de la diferencia de las medias es:

$$] -23.214; -2.711[$$

Tabla 9. Test t de *Zea mays* L. vs hesperidina

Análisis	Valor
t (Valor observado)	-3.095
t (Valor crítico)	2.448
p-valor	0.021
α	0.05

Dado que el valor de p es inferior al nivel de significación $\alpha = 0.05$, la diferencia entre las medias es diferente de cero.

4.2.2 Determinación del marcador del estrés oxidativo, óxido nítrico (NO) (Actividad antioxidante)

4.2.2.1 Resultados de la determinación del óxido nítrico

Tabla 10. Datos de la determinación del marcador oxidativo NO

Tratamiento	Abs
Control	0.290
Control	0.273
Control	0.286
<i>Zea mays</i> L. (50 $\mu\text{g/mL}$)	0.265
<i>Zea mays</i> L. (50 $\mu\text{g/mL}$)	0.254
<i>Zea mays</i> L. (50 $\mu\text{g/mL}$)	0.238
<i>Zea mays</i> L. (100 $\mu\text{g/mL}$)	0.222
<i>Zea mays</i> L. (100 $\mu\text{g/mL}$)	0.219
<i>Zea mays</i> L. (100 $\mu\text{g/mL}$)	0.181
<i>Zea mays</i> L. (200 $\mu\text{g/mL}$)	0.095
<i>Zea mays</i> L. (200 $\mu\text{g/mL}$)	0.068
<i>Zea mays</i> L. (200 $\mu\text{g/mL}$)	0.083

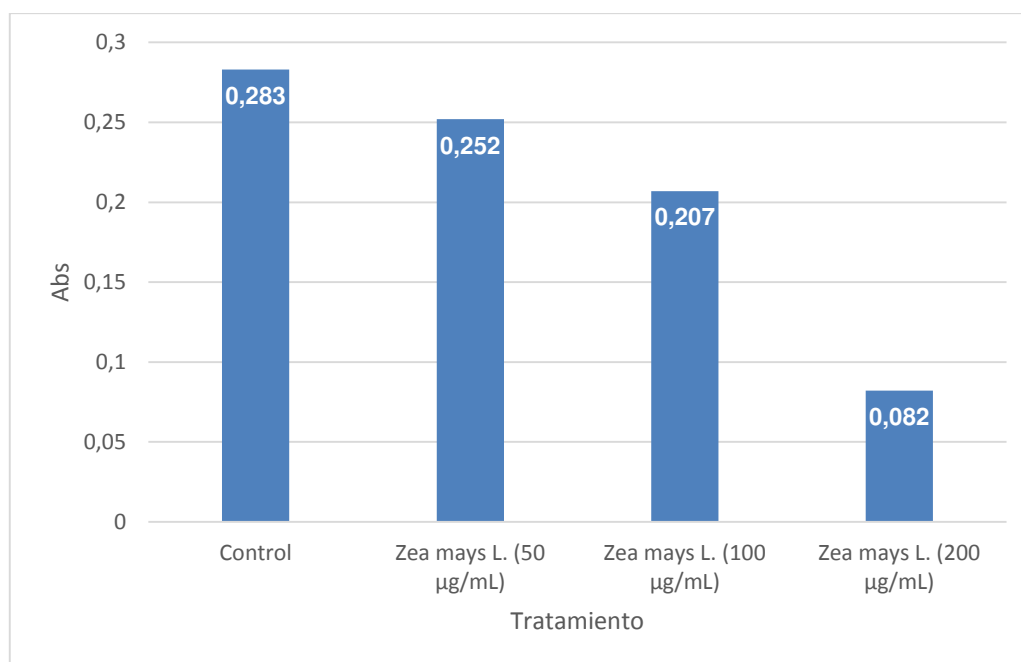


Figura 30. Nivel del marcador de estrés oxidativo óxido nítrico

4.2.2.2 Análisis estadístico

4.2.2.2.1 Estadística descriptiva

Tabla 11. Estadística descriptiva de los resultados de los tratamientos

Variable	Mínimo	Máximo	Media	Error estándar
Control	0.273	0.290	0.283	0.009
<i>Zea mays</i> L. (50 µg/mL)	0.238	0.265	0.252	0.014
<i>Zea mays</i> L.(100 µg/mL)	0.181	0.222	0.207	0.023
<i>Zea mays</i> L.(200 µg/mL)	0.068	0.095	0.082	0.014

4.2.2.2.2 Análisis estadístico mediante el test de Kruskal-Wallis

Con el objetivo de analizar los datos de la determinación de NO se utilizó el test de Kruskal-Wallis.

H_0 Las muestras provienen de la misma población.

H_a Las muestras provienen de diferentes poblaciones.

Tabla 12. Test de Kruskal-Wallis

Análisis	Valor
K (Valor observado)	10.385
K (Valor crítico)	7.815
p-valor	0.016
α	0.05

El valor de p calculado es inferior al nivel de significación $\alpha = 0.05$. Entonces se rechaza la hipótesis H_0 .

4.2.3 Determinación del marcador del estrés oxidativo, malondialdehído (Actividad antioxidante)

4.2.3.1 Resultados de la determinación del malondialdehído (MDA)

Tabla 13. Datos de la determinación del marcador oxidativo MDA

Tratamiento	$\mu\text{mol MDA/mL suero}$
Control	3.46
Control	3.38
Control	3.30
<i>Zea mays</i> L. (50 $\mu\text{g/mL}$)	3.11
<i>Zea mays</i> L. (50 $\mu\text{g/mL}$)	3.05
<i>Zea mays</i> L. (50 $\mu\text{g/mL}$)	3.14
<i>Zea mays</i> L. (100 $\mu\text{g/mL}$)	2.55
<i>Zea mays</i> L. (100 $\mu\text{g/mL}$)	2.45
<i>Zea mays</i> L. (100 $\mu\text{g/mL}$)	2.66
<i>Zea mays</i> L. (200 $\mu\text{g/mL}$)	1.61
<i>Zea mays</i> L. (200 $\mu\text{g/mL}$)	1.83
<i>Zea mays</i> L. (200 $\mu\text{g/mL}$)	1.78

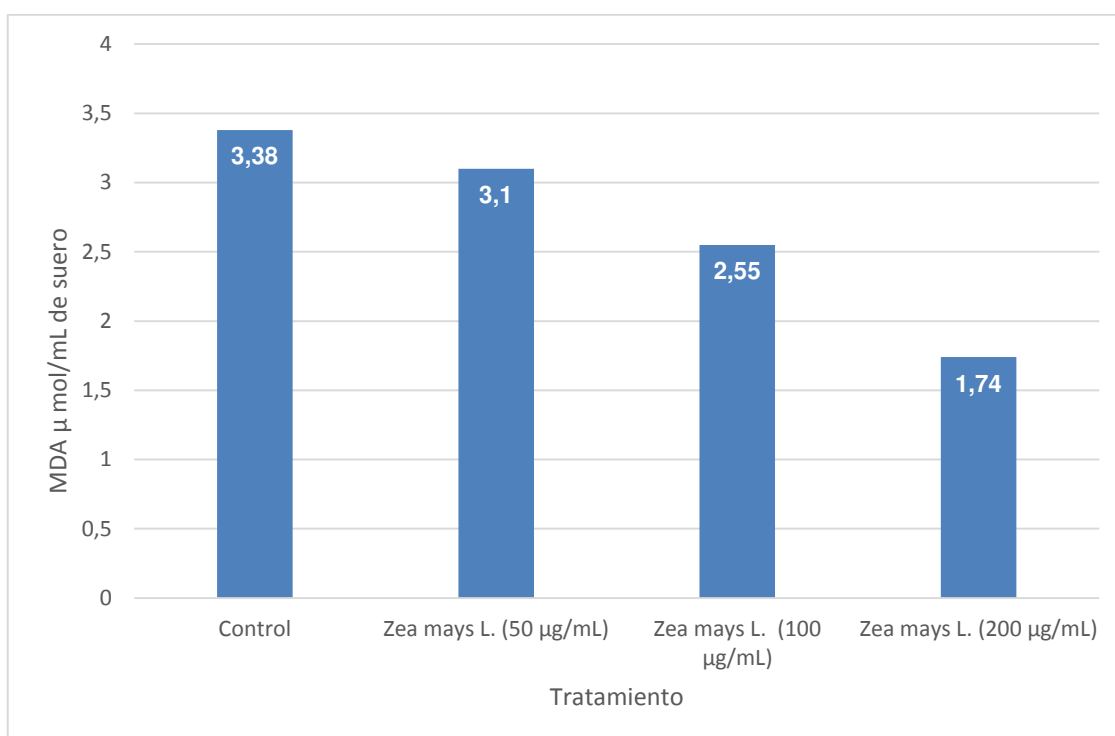


Figura 31. Nivel del marcador de estrés oxidativo malondialdehído

4.2.3.2 Análisis estadístico

4.2.3.2.1 Estadística descriptiva

Tabla 14. Estadística descriptiva de los datos de los tratamientos

Variable	Mínimo	Máximo	Media	Error Estándar
Control	3.30	3.46	3.380	0.080
<i>Zea mays</i> L. (50 $\mu\text{g/mL}$)	3.05	3.14	3.100	0.046
<i>Zea mays</i> L. (100 $\mu\text{g/mL}$)	2.45	2.66	2.553	0.105
<i>Zea mays</i> L. (200 $\mu\text{g/mL}$)	1.61	1.83	1.740	0.115

4.2.3.2.2 Análisis estadístico mediante el test de Kruskal-Wallis

Con el objetivo de analizar los datos de la determinación de MDA se utilizó el test de Kruskal-Wallis.

H_0 Las muestras provienen de la misma población

H_a Las muestras provienen de diferentes poblaciones

Tabla 15. Test de Kruskal-Wallis

Análisis	Valor
K (Valor observado)	10.385
K (Valor critico)	7.815
p-valor	0.016
α	0.05

El valor de p calculado es inferior al nivel de significación $\alpha = 0.05$. Entonces se rechaza la hipótesis H_0 .

V. DISCUSIÓN

Conforme a lo descrito en el capítulo generalidades, el estrés oxidativo es un deterioro progresivo, intrínseco y universal que con el tiempo ocurre en todo ser vivo.⁵ Podría también definirse como todas las alteraciones que se producen en un organismo con el paso del tiempo y que conducen a pérdidas funcionales y, al desarrollo de enfermedades.^{3,17}

De las corontas secas pulverizadas de *Zea mays* L. se obtuvo un extracto de consistencia pastosa y de color morado oscuro, con el que se hicieron los ensayos correspondientes. Mediante la marcha de solubilidad con diferentes solventes de polaridad creciente se observó que los componentes o metabolitos secundarios de *Zea mays* L. son bastante polares como lo muestra la tabla 2. Debido a que se solubilizan en solventes de alta polaridad como los alcoholes y el agua, al realizar la marcha fitoquímica (tabla 3) se notó la presencia mayoritaria de compuestos fenólicos, que pueden ser flavonoides y antocianinas que caracterizan al maíz morado conforme a los estudios realizados por Estribano-Bailón⁸³ y Pascual Teresa⁸⁴.

Los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de *Zea mays* L. fueron visualizados a través de cromatografía en capa fina, y revelados mediante FeCl_3 , luz ultravioleta 254 nm y 366 nm, identificándose 10 fracciones (figura 14) correspondientes a los componentes mayoritarios en el extracto etanólico de las corontas pulverizadas de *Zea mays* L. Como lo muestra las figuras 12 y 14, el extracto etanólico de *Zea mays* L. está constituido principalmente por flavonoides y otros compuestos fenólicos como antocianinas. Al analizar los espectros de las 10 fracciones (figura 16 a figura 25) y luego de compararlos con los espectros registrados por Mabry et al¹⁰⁰, se proponen 3 estructuras químicas; la 5,7-dihidroxi-

4'-metoxiflavona perteneciente a la fracción 1, la 5,7-dihydroxiflavona perteneciente a la fracción 6 y la 5,7,8-trihidroxi-4'-metoxiflavona perteneciente a la fracción 10.

La inflamación es uno de los mecanismos fisiopatológicos sobre el cual los agentes neuroprotectores pueden actuar.^{55,56}

Por ello, se determinó la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *Zea mays* L. mediante la estabilización de la membrana de glóbulos rojos de ratas normales. Se emplearon la quercetina, flavonol con conocida actividad neuroprotectora⁷¹ y antiinflamatoria⁹⁹, la hesperidina, flavonona con actividad neuroprotectora⁷⁰ y antiinflamatoria¹⁰⁰ y el fármaco hidrocortisona como estándares. A partir de los resultados se observa la protección de la membrana de glóbulos rojos mediante la disminución de la hemólisis frente al control, el indicador fue el porcentaje de hemólisis como vemos en la tabla 4 y figura 29.

Los resultados fueron analizados utilizando el test de Shapiro-Wilk con el objetivo de comprobar la distribución normal de la muestra. El valor de p siendo superior a 0.05 para toda las variables analizadas (*Zea mays* L, hidrocortisona, quercetina e hesperidina), se considera entonces que las variables siguen una distribución normal y que, posteriormente, una prueba paramétrica puede emplearse.

Se analizó entonces un análisis de varianza mediante el test de Levene, test diseñado especialmente para muestras pequeñas. El valor de p para esta prueba es superior a 0.05, en consecuencia se acepta la hipótesis nula y se confirma que las varianzas son idénticas.

Este resultado permite continuar con el análisis estadístico y de utilizar el test T. Esta prueba permite saber si hay una diferencia entre las medias de 2 variables.

Se analizaron la variable *Zea mays* L. vs hidrocortisona, fármaco de referencia con reconocida actividad antiinflamatoria. El resultado de este test-T muestra que no hay diferencia entre las 2 medias. Recapitulando, las variables *Zea mays* L. e hidrocortisona siguen una distribución normal, cuyas varianzas y medias son iguales.

Se analizaron la variable *Zea mays* L. vs quercetina, flavonol de referencia con reconocida actividad antiinflamatoria⁹⁹. El resultado de este test-T muestra que no hay diferencia entre las 2 medias. Recapitulando, las variables *Zea mays* L. y quercetina siguen una distribución normal, cuyas varianzas y medias son iguales.

Se analizaron la variable *Zea mays* L. vs hesperidina, flavonona de referencia con reconocida actividad antiinflamatoria¹⁰⁰. El resultado de este test-T muestra que hay diferencia entre las 2 medias. Recapitulando, las medias de las variables *Zea mays* L. y hesperidina no son iguales.

Entonces, debido a que no hay diferencias entre la variable *Zea mays* L. y las variables hidrocortisona y quercetina al nivel estudiado, se podría formular que el extracto de *Zea mays* L. posee una actividad antiinflamatoria.

Para determinar la actividad antioxidante se utilizó el óxido nítrico (NO) como marcador de estrés oxidativo. El NO endógeno en el estado basal tiene una vida media que es inferior a 0.1 S aproximadamente. En cambio, los nitritos y nitratos son metabolitos estables del NO, los cuales se presentan en la sangre y en la orina, por lo que pueden ser fácilmente identificados.

El método más frecuente utilizado para cuantificar nitritos y nitratos; y que ha sido utilizado en esta investigación, está basado en la reacción de Griess, se fundamenta

en la diazotización. Primero, este método requiere que el NO_3^- sea reducido en NO_2^- . Luego, NO_2^- reacciona con el ácido sulfanílico bajo condiciones ácidas para formar un ion diazonio que se acopla con el N-(1-Naftil)-etiléndiamina, que forma a su vez, un complejo cromóforo azo.⁹⁵ Como se ve en la tabla 10 y figura 30 los niveles de óxido nítrico son reducidos a mayor concentración del extracto de *Zea mays* L. respecto al control, lo que evidencia la actividad antioxidante de la muestra en estudio.

Los datos fueron analizados mediante el test de Kruskal-Wallis que confirma que cada variable (tratamiento) es independiente el uno del otro ya que provienen de poblaciones diferentes. Este resultado ratificaría la diferencia de cada tratamiento y, por ende, la tendencia de disminución del NO conforme la concentración del extracto de *Zea mays* L. aumenta.

Para determinar la actividad antioxidante también se utilizó el malondialdehído (MDA) como marcador de estrés oxidativo, mediante la cuantificación de uno de los productos finales de la peroxidación lipídica, que es el malondialdehído (MDA) ya que a diferencia de otros productos de degradación, es relativamente estable siendo su determinación fácil y reproducible. Esta reacción se fundamenta en la capacidad del MDA para reaccionar con el ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar un complejo MDA-TBA que es cuantificado utilizando un espectrofotómetro UV/VIS.^{96,97} Como lo muestra la tabla 13 y la figura 31, a mayor concentración de extracto se correlaciona con una menor concentración del complejo MDA-TBA, lo que evidencia la actividad antioxidante en este caso. A todo lo expuesto, se suma el hecho que el malondialdehído se encuentra incrementado en pacientes con la enfermedad de Parkinson.⁸

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el test de Kruskal-Wallis que confirma que cada variable (tratamiento) proviene de poblaciones diferentes. Si las poblaciones de origen son diferentes, los tratamientos utilizados también lo son; al mismo nivel que su acción farmacológica.

Este resultado ratificaría la diferencia de cada tratamiento y, en consecuencia, la tendencia de disminución de la concentración de MDA en la muestra biológica frente a una mayor concentración del extracto de *Zea mays* L.

De esta manera, los resultados obtenidos prueban la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los componentes del extracto de *Zea mays* L.

Por otro lado, los compuestos fenólicos tales como los flavonoides presentan actividad antioxidante la cual está profundamente relacionada con la actividad neuroprotectora según los estudios realizados por Muralikrishnan et al¹², Ahlemeyer et al¹³ y Rojas et al¹⁰¹. Igualmente, flavonoides con actividad antiinflamatoria muestran actividad neuroprotectora de acuerdo a los estudios realizados por García-Mediavilla V et al.¹⁰ y Galati EM et al.¹¹.

Más aún, Katsura et al⁷⁴ demostraron que las metoxiflavonas presentan actividad neuroprotectora lo que podría sugerir que la 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavona y la 5,7,8-trihidroxi-4'-metoxiflavona encontradas en el extracto etanólico de *Zea mays* L. podría tener actividad neuroprotectora.

Además, se ha evidenciado que las hidroxiflavonas tienen actividad antioxidante según los estudios realizados por Cotelle et al⁷³; lo que podría proponer que la 5,7-dihidroxiflavona, compuesto hallado en el extracto etanólico de *Zea mays* L., muestra actividad antioxidante.

Se evaluó el efecto neuroprotector del extracto de *Zea mays* L. sobre la rigidez inducida por haloperidol en ratas (anexo) observándose un aumento en la fuerza de prensión en las ratas por los extractos del maíz morado, lo que confirma el efecto neuroprotector.

Por todo lo expuesto anteriormente, las actividades antioxidante y antiinflamatoria están estrechamente vinculadas con la actividad neuroprotectora, debido a que la neurodegeneración es causada por radicales libres y estrés oxidativo, además de la inflamación.

VI. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de *Zea mays* L. presenta gran cantidad de metabolitos secundarios de estructura fenólica como flavonoides y antocianinas.
2. El extracto etanólico de *Zea mays* L. presenta actividad antiinflamatoria.
3. El extracto etanólico de *Zea mays* L. presenta actividad antioxidante mediante el dosaje de marcadores del estrés oxidativo, óxido nítrico y malondialdehído.
4. Como las actividades antioxidante y antiinflamatoria están vinculadas con la actividad neuroprotectora, el extracto etanólico *Zea mays* L. presenta actividad neuroprotectora sobre la rigidez inducida por haloperidol en ratas.

VII. RECOMENDACIONES

- Continuar con las investigaciones realizadas en este trabajo confirmando la actividad neuroprotectora mediante otros métodos farmacológicos.
- Definir un marcador analítico de referencia en el extracto de *Zea mays* L.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stintzing, F. C., Stintzing, A. S., Carle, R., Frei, B., & Wrolstad, R. E. Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002; 50(21): 6172–6181.
2. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 1957; 2: 298–300
3. Dhalla NS1, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 2000 Jun;18(6):655-73.
4. Yamamoto Y y Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF- B pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest.* 2001; 107:135–142
5. Beal, Toren Finkel y Nikki J. Holbrook. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing M. F. *Nature*, 2000; 408:239-247.
6. Anthony H. Schapira, DSc, MD, FRCP, FMedSci et al. *Movement Disorders*, 2011; 26(6); 1049-1065.
7. Dexter DT, Holley AE, Flitter WD, et al. Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Mov Disord.* 1994; 9:92–97.
8. Sankar Surendran y Srinivasagam Rajasankar. Parkinson's disease: oxidative stress and therapeutic approaches, *Neurol Sci*, 2010; 31:531–540.
9. Kemal Ugur Tufekci, Ralph Meuwissen et al. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 2012; 88: 69-132.
10. García-Mediavilla V et al. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2

- and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappa B pathway in Chang Liver cells. *Eur J Pharmacol.* 2007; 557(2-3):221-229.
11. Galati EM et al. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid. (Note I): anti-inflammatory and analgesic activity. *Farmacologia* 1994 Nov; 40(11):709-712.
 12. Muralikrishnan Dhanasekaran, Binu Tharakan and Bala V. Manyam. Antiparkinson Drug – *Mucuna pruriens* shows Antioxidant and Metal Chelating Activity. *Phytother. Res.* 2008; 22: 6–11.
 13. Ahlemeyer B1, Krieglstein J. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract. *Cell Mol Life Sci.* 2003 Sep; 60(9):1779-92.
 14. Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chem.* 1986 25:1058-1071.
 15. Fridovich, I. The biology of oxygen radicals. *Science*, 1978; 201:875 - 880.
 16. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Oxford, Clarendon Press, Reino Unido 1989.
 17. Halliwell B, Gutteridge JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990; 186:1-85.
 18. Kanner J, German JB, Kinsella JE. Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1987; 25(4):317-64.
 19. Sawyer DT. The redox thermodynamics for dioxygen species (O_2 , O_2^- , HOO , H_2O_2 and HOO^-) and monooxygen species (O , O^- , OH and OH^-) in water and aprotic solvents. *Oxygen radicals in biology and medicine.* M. G. Simic, K. A. Taylor, J. F. Ward and C. Sonntag. New York, Ed. Plenum Press. 1998; 11-20.
 20. Sastre J, Pallardó FV, Viña J. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life.* 2000; 49(5):427-35.

21. Kanner J, German JB, Kinsella JE (1987). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1987; 25 (4):317-64.
22. Czapski G y Goldstein S. The role of the reactions of NO with superoxide and oxygen in biological systems: A kinetic approach. *Free. Radic. Biol. Med.* 1995 19(6):785-794.
23. Beckman JS y Koppenol WH. "Nitric oxide, superoxide, and peroxyinitrite: the good, the bad and ugly." *Am. J. Physiol.* 1996; 271:C1424-C1437.
24. Doroshow J y Hochstein P. Redox cycling and the mechanism of action of antibiotics in neoplastic diseases, 1982. *Pathology of Oxygen.* New York, Academic Press. 245-253.
25. Bielsky BH y Gebieki, JM. Application of radiation chemistry to biology. *Free radicals in biology.* P. W.A., Academic Press. 1997; 3:1-19.
26. Mason RP. Free radical intermediates in the metabolism of toxicological significance. *Free radicals biology.* W. A. Pryor. New York, Academic Press. 1982 262-165.
27. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation: some problems and concepts. En: *Oxygen radicals and tissue injury.* Halliwell B. (Ed.). Bethesda Am Soc Exp Biol. 1988; 9-19.
28. Y. Dotan, D. Lichtenberg, I. Pinchuk. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Progress in Lipid Research* 2004; 43: 200–227.
29. Jeffrey B. Harborne, Christine A. Williams. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000; 55:481-504.
30. P. Bridle & C. F. Timberlake *Food Chemistry.* Vol. 58, No. 1-2, pp. 103-109, 1997

31. V Kamei, H., Hashimoto, Y., Koide, T., Kojima, T., Hasegawa, M. Anti-tumor effect of methanol extracts from red and white wines. *Cancer Biotherapy and Radiopharmacology* 1998; 13 (6): 447–452.
32. Jin-Ming Kong, Lian-Sai Chia et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 2003 64:923–933.
33. Bettini, V., Fiori, A., Martino, R., Mayellaro, R. & Ton, P. Study of the mechanism whereby anthocyanosides potentiate the effect of catecholamines on coronary vessels. *Fitoterapia*, 1985; 2: 67-72.
34. Hardmann JA, Limbard LE, Goodman A. *Pharmacological basis therapeutics*. US: Mc Graw-Hill Inc.; 1998, p. 1465.
35. José R. Regueño, Carlos Lopez Larrea. *Inmunología Biología y patología del sistema inmune*. Editorial Médica panamericana, S. A. ISBN: 84-7903-403-3. 1996: 97-110.
36. Zhang Y y Herman B. Apoptosis and successful aging. *Mech Ageing Dev* 2002. 123:563–565.
37. Chung HY, Kim HJ, Kim KW, Choi JS, Yu BP (2002). Molecular inflammation hypothesis of aging based on the anti-aging mechanism of calorie restriction. *Microsc Res Tech*. 59:264-272.
38. Rodriguez MI et al. Chronic melatonin treatment prevents age-dependent cardiac mitochondrial dysfunction in senescence-accelerated mice. *Free Radic Res*, 2007; 41:15–24.
39. Goto M, Katayama KI, Shirakawa F y Tanaka I. Involvement of NF- κ B p50/p65 heterodimer in activation of the human pro-interleukin-1 β gene at two sub regions of the upstream enhancer element. *Cytokine* 1999; 11:16–28.

40. Taylor B, de Vera ME, et al. Multiple NF- κ B enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273:15148–15156.
41. Franceschi Cy Bonafe M. Centenarians as a model for healthy aging. *Biochem Soc* 2003;31:457-461.
42. Jose A Obeso, Maria C Rodriguez-Oroz. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. *Nature medicine* 2010; 16 (6): 653-661.
43. Farrer, M. et al. Comparison of kindreds with parkinsonism and alpha-synuclein genomic multiplications. *Ann. Neurol*. 2004; 55: 174–179.
44. Cuervo, A.M., Stefanis, L., Fredenburg, R., Lansbury, P.T. & Sulzer, D. Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science* 2004; 305:1292–1295.
45. Marsden, C. D. Neuromelanin and Parkinson's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* 1983; 19:121–141.
46. Anthony H. Schapira, DSc, et al. Etiology and Pathogenesis of Parkinson's Disease. *Movement Disorders* 2011; 26 (6):1049-1055.
47. Graham DG. On the origin and significance of neuromelanin. *Arch Pathol Lab Med*. 1979; 103:359–362.
48. Spina MB, Cohen G. Dopamine turnover and glutathione oxidation: implications for Parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci*, 1989; 86:1398-1400.
49. Sankar Surendran, Srinivasagam Rajasankar. Parkinson's disease: oxidative stress and therapeutic approaches. *Neurol Sci* 2010; 31:531–540.
50. Kevin J. Barnham, Colin L. Masters y Ashley I. Bush. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nature reviews*, 2004; (3):205-214.

51. Le WD, Rowe DB, Xie W, et al. Activated microglia induce dopaminergic cell injury *in vitro*. XIII International Congress on Parkinson's Disease, Parkinsonism, and Related Disorders, 1999; 5(2):S19.
52. A. Taupenot L, Ciesielski-Treska J, Ulrich G, et al. Chromogranin A triggers a phenotypic transformation and the generation of nitric oxide in brain microglial cells. *Neuroscience* 1996; 72:377-389.
53. Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Taupenot L, et al. Chromogranin A induces a neurotoxic phenotype in brain microglial cells. *J Biol Chem* 1998; 273:14339-14346.
54. Edith McGeer, PhD, Koji Yasojima, MD, Patrick L. McGeer, Inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease MD. *BCM J*, Vol. 43, No. 3, April 200, 138-141.
55. Silvia Mandel et al. Neuroprotective Strategies in Parkinson's Disease. *CNS Drugs* 2003; 17 (10): 729-762.
56. Ted M. Dawson et al. Neuroprotective and neurorestorative strategies for Parkinson disease. *Nature neuroscience supplement* 2002; 5: 1058-1061.
57. J.G. Handique, J.B. Baruah, Polyphenolic compounds: an overview *Reactive & Functional Polymers* 52 2002; 163–188.
58. Kelsey, N.A., Wilkins, H.M., Linseman, D.A. Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules* 2010; 15: 7792–7814.
59. Azadeh Ebrahimi, Hermann Schluesener. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: Potentials and pitfalls *Ageing Research Reviews* 2012; 11:331-332.

60. Justyna Mierziak, Kamil Kostyn and Anna Kulma Flavonoids as Important Molecules of Plant Interactions with the Environment *Molecules* 2014; 19: 16240–16265.
61. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; 20: 933–956.
62. Seyoum, A.; Asres, K.; El-Fiky, F.K. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Phytochemistry* 2006; 67: 2058–2070.
63. Amić, D.; Davidović-Amić, D.; Bešlo, D.; Trinajstić, N. Structure-radical scavenging activity relationships of flavonoids. *Croat. Chem. Acta* 2003; 76: 55–61.
64. Arora, A.; Byrem, T.M.; Nair, M.G.; Strasburg, G.M. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000, 373, 102–109.
65. Buettner, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch. Biochem. Biophys.* 1993, 300, 535–543.
66. Kurowska EM, Manthey JA. Hypolipidemic effects and absorption of citrus polymethoxylated flavones in hamsters with diet-induced hypercholesterolemia. *J Agric Food Chem*, 2004; 52: 2879–2886.
67. Conesa CM, Ortega VV, Gascon MJY, Banos MA, Jordana MC, Benavente-Garcia O, Castillo J. Treatment of metastatic melanoma B16F10 by the flavonoids tangeretin, rutin, and diosmin. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 6791–6797, 2005.

68. Manthey JA, Guthrie N, Grohmann K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr Med Chem* 2001; 8:135–153.
69. Pan MH, Chen WJ, Lin-Shiau SY, Ho CT, Lin JK. Tangeretin induces cell-cycle G1 arrest through inhibiting cyclin-dependent kinases 2 and 4 activities as well as elevating Cdk inhibitors p21 and p27 in human colorectal carcinoma cells. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1677–1684.
70. Datla KP, Christidou M, Widmer WW, Rooprai HK, Dexter DT. Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroreport* 2001; 12: 3871–3875.
71. Kuppusamy Tamilselvam, Nady Braidy et al. Effect of quercetin and desferrioxamine on 6-hydroxydopamine (6-OHDA) induces neurotoxicity in striatum of rats. *The journal of toxicological sciences*, 2013 38(1): 25-33.
72. Kuppusamy Tamilselvam, Nady Braidy. Neuroprotective Effects of Hesperidin, a Plant Flavanone, on Rotenone-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in a Cellular Model for Parkinson's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013; 1-11.
73. Cotellet, N.; Bernier, J.L.; Catteau, J.P.; Pommery, J.; Wallet, J.C.; Gaydou, E.M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. *Free Radic. Biol. Med.* 1996, 20: 35–43.
74. Katsura Takano, Yoshiyuki Tabata, Yasuko Kitao, Methoxyflavones protect cells against endoplasmic reticulum stress and neurotoxin *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292: C353–C361.
75. Yang Z, Zhai W. Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2010; 11(1): 169-176.

76. Escribano-Bailón MaT, Santos BC, Rivas-Gonzalo JC. Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography*. 2004; 1054, 129-141.
77. Brack, A., 1999. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles de Perú. Centro de Estudios Regionales Andinos "Bartolomé de las Casas". Cuzco.
78. Manrique ChP. El maíz en el Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 1997. Lima. pp 362.
79. Mapes, C et al. Origen y diversificación del maíz: Una revisión analítica. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, universidad Autónoma de México. 2009, p21.
80. Terranova Producción agrícola I Terranova editor vol 1 Colombia 1995.
81. Leon, C. 1968 Fundamentos botánicos de los cultivos tropicales. Instituto Interamericano de ciencias agrícolas de la O.E.A. San José de Costa Rica.
82. Fredy Quispe Jacobo et al. Características morfológicas y químicas de 3 cultivares de maíz morado (*Zea mays* L.) en Arequipa – Perú *Rev Soc Quím Perú*. 2001; 77 (3):205-217.
83. Escribano-Bailón MaT, Santos BC, Rivas-Gonzalo JC. Anthocyanins in cereals. *Journal of Chromatography*. 2004; 1054, 129-141.
84. Pascual Teresa S.; Santos-Buelga C.; & Rivas-Gonzalo J.C. LC-MS. Analysis of anthocyanins from purple corn cob. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2002; 82, 1003-1006.
85. Bolivar A, Cevallos-Casals, Cisneros-Zevallos L. Stability of anthocyanins-based aqueous extracts of Andean purple corn and red-fleshed sweet potato compared to synthetic and natural colorants. *Food Chemistry*. 2004; 86: 69-77
86. Markakis P. Anthocyanins as food additives. In *Anthocyanins as food colours* (pp 245-253). New York: Academic Press (Chapter 9). 1982.

87. Francis F. Colourants. Anthocyanins. Critical Review in Food Science and Nutritive. 1989; 28: 273-314.
88. Mazza G, Miniati E. Introduction. In Anthocyanin in fruit, vegetables and grains (pp 1-28). Boca Raton, FL: CRC Press (Chapter 1). 1993.
89. Ronceros G, Ramos W, Arroyo J, Galarza C, Ericson L, Gutierrez A, et al. Estudio comparativo del maíz morado (*Zea mays* L.) y simvastatina en la reducción de lípidos séricos de pacientes diabéticos normotensos con dislipidemia. An Fac med. 2012; 73 (2):113-117.
90. Tsuda T, Horio F, Uchida K, Aoki H, Osawa T: Dietary cyaniding 3-O-beta-D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. J Nutr. 2003; 133:2125–2130.
91. Sun-Hwa K, In-Sook A, Su-Ok K, Chang-Suk K, Hae-Young C, Myoung-Sool D, et al. Anti-Obesity and Hypolipidemic Effects of Black Soybean Anthocyanins. J Med Food. 2007; 10 (3), 552–556.
92. Arroyo J, Raez E, Rodríguez M, Chumpitaz V, Burga J, De la Cruz W, et al. Reducción del colesterol y aumento de la capacidad antioxidante por el consumo crónico de maíz morado (*Zea mays* L) en ratas hipercolesterolémicas. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2007; 24(2):157-62.
93. Arroyo J, Raez E, Rodríguez M, Chumpitaz V, Burga J, De la Cruz W, et al. Actividad antihipertensiva y antioxidante del extracto hidroalcohólico atomizado de Maíz morado (*Zea mays* L) en ratas. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2008; 25(2): 195-99.
94. Jae-Jong K, Joo-Heon H, Hee Kyoung J, Yoo Seok J, Kyung-Hyun C. Grape skin and loquat leaf extracts and acai puree have potent anti-atherosclerotic and anti-

- diabetic activity in vitro and in vivo in hypercholesterolemic zebrafish. International Journal of Molecular Medicine. 2012; 30: 606-614.
95. Wang Y, Zhang Y, Wang X, Liu Y, Xia M. Supplementation with Cyanidin-3-O-b-Glucoside Protects against Hypercholesterolemia- Mediated Endothelial Dysfunction and Attenuates Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. The Journal of Nutrition Nutrition and Disease. 2012.
 96. Arroyo J et al. Manual de modelos experimentales de farmacología. Primera edición. Publicaciones Asdimor 2004, 24.
 97. Dimitrios Tsikas. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays basedon the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction Journal of Chromatography B, 851 (2007) 51–70.
 98. Buege J, Aust S. Microsomal lipid peroxidation. Methods in enzymology. 1978; 52: 302-310.
 99. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95:351-351.
 100. Mabry et al. Systemic identification of flavonoids. Springer-Verlag. 1970; 35-230.
 101. Patricia Rojas, Pedro Montes et al. Effect of a phytopharmaceutical medicine, Ginko biloba extract 761in an animal model of Parkinson's disease: Therapeutic perspectives. Article in press. Nutrition 2012; 1–8.

IX. ANEXOS

ANEXO I : EFECTO NEUROPROTECTOR DEL EXTRACTO DE *Zea mays* L. SOBRE LA RIGIDEZ INDUCIDA POR HALOPERIDOL EN RATAS

	Tratamiento	Fuerza de prensión (g)
1	Blanco	440
2	Blanco	523
3	Blanco	631
4	Haloperidol	280
5	Haloperidol	310
6	Haloperidol	367
7	Grupo Maíz morado dosis 100 mg/kg	455
8	Grupo Maíz morado dosis 100 mg/kg	279
9	Grupo Maíz morado dosis 100 mg/kg	324
10	Grupo Maíz morado dosis 500 mg/kg	324
11	Grupo Maíz morado dosis 500 mg/kg	450
12	Grupo Maíz morado dosis 500 mg/kg	490
13	Grupo Maíz morado dosis 1000 mg/kg	345
14	Grupo Maíz morado dosis 1000 mg/kg	400
15	Grupo Maíz morado dosis 1000 mg/kg	550

Los animales recibieron tratamiento diario vía oral durante dos meses, se midió la fuerza de prensión (se retiraba a la rata, estando ella sobre una jaula metálica).

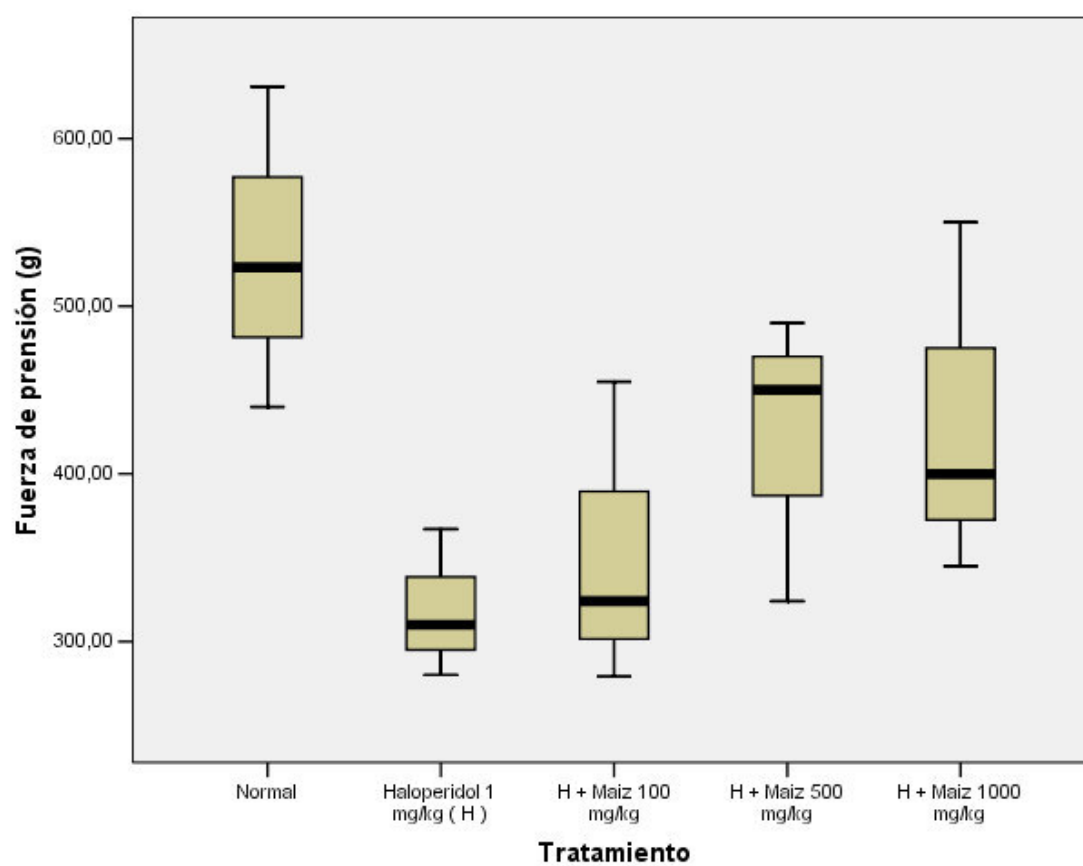


Figura 1. Efecto neuroprotector del extracto de *Zea mays* L. sobre la rigidez inducida por haloperidol en ratas.

Descriptivas								
Fuerza de prensión (g)								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
Normal	3	531,333333	95,7722994	55,2941628	293,421753	769,244914	440	631
Haloperidol 1 mg/kg (H)	3	319	44,1927596	25,5147016	209,219099	428,780901	280	367
H + Maiz 100 mg/kg	3	352,666667	91,4348584	52,7899401	125,529887	579,803447	279	455
H + Maiz 500 mg/kg	3	421,333333	86,6333269	50,0177746	206,124219	636,542448	324	490
H + Maiz 1000 mg/kg	3	431,666667	106,105294	61,2599198	168,086505	695,246828	345	550
Total	15	411,2	105,944864	27,3548464	352,52969	469,87031	279	631

ANOVA					
Fuerza de prensión (g)					
Tratamiento	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	80641,73333	4	20160,4333	2,6353967	0,09749916
Within Groups	76498,66667	10	7649,86667		
Total	157140,4	14			